

TALINE PINHEIRO DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE HEMICELULOSES DO  
PARÊNQUIMA DE *Aloe barbadensis* Miller**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Pós-Graduação em Ciências-Bioquímica,  
Setor Ciências Biológicas, Universidade  
Federal do Paraná como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Mestre em  
Ciências – Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá  
Co-orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup> Maria Eugênia  
D. Nosedá

CURITIBA  
2011

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Silva, Taline Pinheiro da

Caracterização química de hemiceluloses do parênquima de *aloe barbadensis* Miller./ Taline Pinheiro da Silva – Curitiba, 2013.  
108f.: il. ; 30cm.

Orientador: Miguel Daniel Nosedá

Co-orientadora: Maria Eugênia Duarte Nosedá

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

1. Hemicelulose. 2. Aloe barbadensis. I. Título II. Nosedá, Miguel Daniel. III. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

CDD (20. ed.) 574.192

À minha mãe, Raquel, por seu amor, sua força e perseverança,  
por acreditar e me ajudar a realizar meus objetivos.

Ao Thiago, por seu amor, confiança e apoio,  
que nunca me deixou desistir de meus sonhos.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, que com seu amor incondicional me deu todas as condições para realizar meus sonhos. Que não mediu forças, e trabalhou exaustivamente para ver sua filha formada, algo com o qual ela jamais sonhara. Obrigada por me ajudar na teimosia de estudar. Eu não seria nada sem você em minha vida, é por você que guardo forças para viver e lutar por meu (por nosso) lugar ao sol. Espero em breve poder retribuir tudo que me fez.

Ao Thiago, que sempre esteve ao meu lado me incentivando e acreditando, por seu amor e por estar ao meu lado no ano que passou em especial, muito obrigada. Você, que me conheceu com o sonho de ser mestre em Bioquímica há alguns anos, está hoje ao meu lado vendo este sonho se concretizar. Obrigada por me dividir com a bioquímica. Talvez eu não tivesse conseguido sem você.

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Miguel D. Nosedá, pela orientação, pelas idéias, pela compreensão e incentivo. Agradeço a oportunidade de trabalhar ao seu lado e compartilhar de sua experiência.

À minha co-orientadora, Prof<sup>o</sup> Maria Eugênia D. Nosedá, pela ajuda nas análises de metilação.

Ao pessoal do laboratório 248 e E3, que sempre teve um tempinho para ensinar e disposição para emprestar. Pelas conversas agradáveis, as risadas e o apoio, obrigada – Luciana, Juliana, Siliane, Franciele, Pauline, Tatiane, Luciano, Louise, Ju e Jenifer. À Louise, em especial, que foi a primeira pessoa a me ensinar aquelas coisas básicas de laboratório, isso em 2007, quando assumi o trabalho de IC que ela fazia.

Ao pessoal dos outros laboratórios, sempre dispostos a dar uma mão quando possível, pelos palpites, idéias e conhecimento sempre à disposição.

À Prof<sup>o</sup> Lyz Mary B. Candido, que me orientou na iniciação científica e sempre me incentivou a seguir nesse caminho, que me fez crer que eu seria capaz de realizar outros trabalhos científicos. Agradeço a oportunidade de trabalhar contigo e compartilhar de sua experiência.

Às minhas amigas nutricionistas, Alessandra, Verônica Ramos e Veronica Balsano, Greyce e Adriele, e o amigo nutricionista, o Evandro, que me viram realizar este sonho e me apoiaram, ainda estou devendo aquele chop no Alemão.

Obrigada aos novos colegas da graduação, que me deram uma mão com a faculdade para eu terminar o mestrado.

À Ju, que teve um papel essencial na minha vida e para a conclusão desse trabalho - obrigada por ser minha amiga e adoro ser sua vizinha.

Às minhas amigas Rosana, Kelly, Karina, Claudinha, apesar de minha significativa ausência nesses tempo de mestrado, continuam sendo amigas, mesmo longe.

À ONG “Em Ação”, um pré-vestibular gratuito onde os professores, voluntários, dão aulas no final de semana. Obrigada pelo tempo dedicado, pela oportunidade, pelo apoio e pela confiança. Se não fosse o otimismo e boa vontade dessas pessoas, que doaram seus finais de semana para passar aos seus alunos conhecimentos e confiança, talvez eu não tivesse aqui hoje. Obrigada pela oportunidade de poder contribuir com a ONG, agora como professora. Porque não me resta mais nada além de retribuir o bem que a ONG fez à minha vida. Que a ONG continue a crescer e a mudar a vida das pessoas. Obrigada por mudar a minha vida, fazer parte da minha história. Obrigada por me deixar fazer parte dessa história.

A coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, representada pelo Prof<sup>o</sup>. Dr. Miguel D. Nosedá e a Prof<sup>o</sup> Sílvia Maria Suter Correia Cadena.

Ao CnPQ e PRONEX- Carboidratos pelo suporte financeiro.

A todos que me apoiaram de alguma forma e que porventura não tenha citado.

Obrigada a todos!!!!

“A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria”

Will Durant

“Sejamos realistas, exijamos o impossível”

Che Chevara

## LISTA DE LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS, SIGLAS

$\alpha$  - Alfa

$\beta$  - Beta

$\mu\text{l}$  - Microlitro

$\mu\text{m}$  - Micrometro

$\mu\text{g}$  – micrograma

nm – nanômetros

$\Delta$  – ppm

$^{13}\text{C}$  - Carbono treze

A1 – Fração obtida a partir da 1º extração alcalina com NaOH 0,5M

A2 – Fração obtida a partir da 2º extração alcalina com NaOH 0,5M

A3 – Fração obtida a partir da 3º extração alcalina com NaOH 0,5M

A4 – Fração obtida a partir da 4º extração alcalina com NaOH 0,5M

A5 – Fração obtida a partir da 5º extração alcalina com NaOH 0,5M

A6 – Fração obtida a partir da 6º extração alcalina com NaOH 0,5M

A7 – Fração obtida a partir da 7º extração alcalina com NaOH 0,5M

A8 – Fração obtida a partir da 1º extração alcalina com NaOH 2M

A9 – Fração obtida a partir da 2º extração alcalina com NaOH 2M

A10 – Fração obtida a partir da 3º extração alcalina com NaOH 2M

A11 – Fração obtida a partir da 4º extração alcalina com NaOH 2M

A12 – Fração obtida a partir da 4º extração alcalina com NaOH 2M

A13 – Fração obtida a partir da extração alcalina com NaOH 0,5M por 2h a 80°C

A14 – Fração obtida a partir da extração alcalina com NaOH 2M por 2h a 80°C



A15 – Fração obtida a partir da extração alcalina com NaOH 4M

A16 – Fração obtida a partir da extração alcalina com NaOH 4M

Ara – Arabinose

BaSO<sub>4</sub> – Sulfato de bário

BaCl<sub>2</sub> – Cloreto de bário

F – Fração extraída à frio

Fuc - Fucose

Gal - Galactose

Glc - Glucose

GLC – cromatografia líquida gasosa

*HPSEC - Cromatografia de exclusão estérica de alta performance* HCl – Ácido clorídrico

KDa – Kilodalton

KOH – Hidróxido de potássio

*MALLS - Detector de espalhamento de luz laser em multiângulos*

Man - Manose

NaBH<sub>4</sub> – Borohidreto de sódio

NaBD<sub>4</sub> - Borohidreto deuterado

NaN<sub>3</sub> - azida de sódio

NaNO<sub>2</sub> . nitrito de sódio

NaNO<sub>3</sub> . nitrito de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

Q1 - Fração obtida a partir da extração à quente pela primeira vez

Q2 - Fração obtida a partir da extração à quente pela segunda vez

Rha - Ramnose

Rib - Ribose

RMN - ressonância nuclear magnética

TFA – Ácido tri

X-1 – Fração obtida a partir do agrupamento das frações extraídas a 0,5M

X-2 - Fração obtida a partir do agrupamento das frações extraídas a 2M

X-1-P – Fração insolúvel obtida a partir do fracionamento por solubilidade

X-1-S – Fração solúvel obtida a partir do fracionamento por solubilidade

X-2-P – Fração insolúvel obtida a partir do fracionamento por solubilidade

X-2-S – Fração solúvel obtida a partir do fracionamento por solubilidade

X-1-PF – Fração insolúvel obtida a partir do fracionamento por precipitação de Fehling

X-1-SF – Fração solúvel obtida a partir do fracionamento precipitação por precipitação de Fehling

X-2-PF – Fração insolúvel obtida a partir do fracionamento por precipitação de Fehling

X-2-SF – Fração solúvel obtida a partir do fracionamento precipitação por precipitação de Fehling

Xyl - Xilose

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	PRINCIPAIS FIBRAS PRESENTES NA ALIMENTAÇÃO .....	25
TABELA 2	RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA FRAÇÃO FIBROSA DE <i>A. barbadensis</i> .....	63
TABELA 3	PORCENTAGEM DE PROTEÍNA, CARBOIDRATOS TOTAIS E ÁCIDOS URÔNICOS NOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE FF DE <i>A. barbadensis</i> .....	64
TABELA 4	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS (mol%) .....	66
TABELA 5	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE X-2-, X-2-S E X- 2-P.....	85
TABELA 6	PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE X-2-P.....	87
TABELA 7	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE X-1-PF (MOL%)..	89
TABELA 8	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE X-2-PF (MOL%)..	92
TABELA 9	PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE X-2-P.....	94

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	FOTO DE (a) <i>Aloe barbadensis</i> e da (b) FOLHA DE <i>Aloe barbadensis</i> .....	27
FIGURA 2	ESQUEMA DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA.....	32
FIGURA 3	ESQUEMA DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I DE DA MAIORIA DAS PLANTAS FLORESCENTES (ANGIOSPERMAS).....	36
FIGURA 4	ESQUEMA DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO II	38
FIGURA 5	ESTRATÉGIA DE AÇÃO PARA OBTENÇÃO DE HEMICELULOSES EXTRAÍDAS DE <i>Aloe barbadensis</i> .....	54
FIGURA 6	ESTRATÉGIA DE FRACIONAMENTO E SEPARAÇÃO DO MATERIAL SOLÚVEL E INSOLÚVEL DAS FRAÇÕES X-1 E X-2.....	55
FIGURA 7	ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE FEHLING.....	57
FIGURA 8	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO EXTRAÍDAS A FRIO DE <i>Aloe barbadensis</i> (F).....	68
FIGURA 9	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS A QUENTE DE <i>Aloe barbadensis</i> (a) Q1 (b) Q2.....	69
FIGURA 10	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS COM NaOH 0,5M DE <i>Aloe barbadensis</i> (a) A1 (b) A2 (c) A3 (d) A5 (e) 6.....	72
FIGURA 11	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS	

	FRAÇÕES EXTRAÍDAS COM NaOH 2M DE <i>Aloe barbadensis</i> (a) A8 (b) A9 (c) a10 (d) A11.....	74
FIGURA 12	PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES DE <i>Aloe barbadensis</i> (a) A12 (b) A13 (c)A14 (d) A15.....	76
FIGURA 13	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO F, OBTIDO A 50°C .....	73
FIGURA 14	MANANA PARCIALMENTE ACETILADA .....	78
FIGURA 15	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q1, OBTIDO A 70°C.....	79
FIGURA 16	ESPECTRO DERMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q1, OBTIDO A 70°C, EM SOLUÇÃO ALCALINA (0,5 M).....	79
FIGURA 17	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO A5 OBTIDO A 50°C.....	80
FIGURA 18	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES (A) A8 (B) A9 (C) A10 (D) A11 OBTIDO A 50°C.....	82
FIGURA 19	ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS AMOSTRAS A8, A9 E A10 (a) REGIÃO ANOMÉRICA DAS FRAÇÕES A8, A9 E A10 (b) ESPECTRO COMPLETO DAS AMOSTRAS A8, A9 E A10.....	83
FIGURA 20	ESPECTROS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DE A) X-2 B) X-2- S....	86
FIGURA 21	ESTRUTURA QUÍMICA DE XILANA $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-LIGADA	88
FIGURA 22	ESTRUTURA QUÍMICA DE GLUCANA (1 $\rightarrow$ 4)-LIGADA	88
FIGURA 23	PERFIL DE ELUIÇÃO DE X-1-PF EM HPSEC-MALLS	89
FIGURA 24	ESPECTRO DE RMN 2D HSQC DE X-1-PF OBTIDO À 50°C.....	91
FIGURA 25	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ X-1-PF OBTIDO A 50°C.....	91
FIGURA 26	PERFIL DE ELUIÇÃO DE X-2-PF EM HPSEC-MALLS..	92
FIGURA 27	ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DE X-2-PF A 50°C.....	93

FIGURA 28	ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA GLUCOMANANA.....	95
FIGURA 29	ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA XILANA $\beta$ - (1 $\rightarrow$ 4)-LIGADA .....	95

## RESUMO

Extratos de *Aloe barbadensis* (babosa) são amplamente utilizados como agentes terapêuticos, na indústria cosmética e de alimentos. A mucilagem de babosa é isolado do parênquima das folhas e contém fibras solúveis e insolúveis. Considerando a inexistência na literatura de estudos que caracterizem as fibras insolúveis de *Aloe barbadensis*, o objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar esse tipo de polissacarídeos. Para isso, a fração insolúvel foi submetida a extrações seqüenciais nas seguintes condições: extrações aquosas a 25°C e a 80°C, e extrações alcalinas com aumento sucessivo da molaridade, entre 0,5 e 4 M. Para análise dos extratos, foram utilizados os seguintes métodos analíticos: dosagem de açúcar total, dosagem de proteína, HPSEC-MALLS, composição monossacarídica e RMN de  $^{13}\text{C}$ . Na fração insolúvel (X-2-P), extraída com NaOH 2 M, os dados obtidos por RMN de  $^{13}\text{C}$  juntamente com a composição monossacarídica e análises de metilação indicam a presença de uma  $\beta$ -xilana linear (1 $\rightarrow$ 4)-ligada. Quanto às frações obtidas por precipitação de Fehling, X-1-PF é composta basicamente de glucose e xilose, e a proporção de monossacarídeos indica a presença de uma xiloglucana. X-2-PF é uma fração homogênea composta principalmente de manose e glucose, e de acordo com as análises de metilação, sugere-se a presença de uma galactoglucomanana.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Aloe barbadensis*, hemiceluloses, xilana

## ABSTRACT

Extracts of *Aloe barbadensis* (babosa) are widely used as therapeutic agents, in cosmetic and food industries. The babosa is isolated from the parenchyma of leaves and presents soluble and insoluble fibers. Considering the inexistence in literature of studies that characterize the insoluble fibers from the gel of *Aloe barbadensis*, the aim of the present work was to isolate and characterize this type of polysaccharides. For that, the insoluble fraction was submitted to sequential extractions in the following conditions: aqueous extractions at room temperature and at 80°C, and alkaline extractions with successive increase of molarity between 0.5 and 4 M. For extracts analysis the following analytical methods were used: determination of total sugar and protein, HPSEC-MALLS, monosaccharide composition and  $^{13}\text{C}$  NMR. In the insoluble fraction (X-2P), extracted with 2 M NaOH, the data obtained by  $^{13}\text{C}$  NMR together with monosaccharide composition and methylation analysis indicates the presence of a linear  $\beta$ -xylan (1 $\rightarrow$ 4)-linked. Regarding the fractions obtained by Fehling precipitation, X-1PF is basically composed of glucose and xylose, and the monosaccharide proportion indicates the presence of a xyloglucan. X-2PF is a homogeneous fraction mainly composed by mannose and glucose, and its methylation analysis suggests the presence of a galactoglucomannan.

**Keywords:** *Aloe barbadensis*, hemicelluloses, xylan



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>21</b>
2.1 PLANTAS E MEDICINA .....	21
2.2 FIBRA ALIMENTAR .....	22
2.3 GÊNERO ALOE.....	26
2.3.1 <i>Aloe barbadensis</i> (nome popular: Aloe vera, aloe ou babosa).....	26
2.3.2 Uso de <i>Aloe barbadensis</i> (babosa) .....	28
2.3.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>A. barbadensis</i> .....	29
2.4 PAREDE CELULAR.....	31
2.4.3 Parede celular de angiospermas.....	39
2.5 HEMICELULOSES .....	41
2.5.1 Xilanas .....	45
2.5.2 Xiloglucanas .....	45
2.5.3 Arabinoxilanas .....	46
2.5.4 Glucanas .....	47
2.5.5 Galactoglucomananos .....	48
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>50</b>
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>51</b>
4.1 Objetivo geral.....	51
4.2 Objetivos específicos.....	51
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>52</b>
5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL ANALISADO .....	52
5.3 FRACIONAMENTO POR SOLUBILIDADE .....	55
5.4 PRECIPITAÇÃO DE FEHLING .....	56
5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS .....	56
5.5.1 Dosagem de proteína total .....	56
5.5.2 Dosagem de carboidratos totais.....	57
5.5.3 Dosagem de ácido urônico.....	57
5.5.4 Cromatografia de Camada Delgada (CCD) .....	58
5.5.5 Composição monossacarídica.....	58
5.5.5.1 Hidrólise ácida total .....	58
5.5.5.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise.....	59
5.5.6 Cromatografia líquido gasosa (GLC) .....	59

5.5.7 Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS) .....	60
5.5.8 Análise por RMN – $^{13}\text{C}$ .....	60
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSAO.....</b>	<b>63</b>
6.1 EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DE POLISSACARÍDEOS DE <i>A. barbadensis</i> .....	63
6.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA .....	66
6.3 ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-RID DOS EXTRATOS .....	67
6.4 Caracterização dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$ ..	77
6.5 FRACIONAMENTO POR SOLUBILIDADE DE X-1 E X-2 .....	84
6.5.1 Fracionamento por solubilidade de X-1 .....	84
6.5.2 Fracionamento por solubilidade de X-2 .....	84
6.5.2.1 Análise de metilação de X-2-P .....	87
6.6 PRECIPITAÇÃO DE FEHLING .....	88
6.6.1 Precipitação de Fehling da fração X-1-S .....	88
6.6.2 Precipitação de Fehling da fração X-2-S .....	92
6.6.2.1 Análise de metilação de X-2-PF .....	93
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>97</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Vegetais superiores são uma fonte natural de moléculas com funções biológicas que podem ser utilizadas como medicamentos ou alimentos funcionais. Seu uso tem se tornado cada vez mais comum, devido à tendência atual de se utilizar produtos naturais.

Entre as diversas moléculas naturais com atividade biológica relatadas na literatura, há os polissacarídeos, moléculas orgânicas mais abundantes na natureza e amplamente presentes no corpo humano no espaço extracelular, atuando como imunoestimulador, possuindo atividade anti-tumoral, entre outras funções. Além disso, tais moléculas possuem amplo potencial de uso na indústria alimentícia, farmacêutica e química, através do uso destes polímeros naturais ou modificados.

*Aloe barbadensis* contém uma mucilagem que popularmente é conhecida como gel de babosa, de modo que a denominação “gel” será utilizada neste trabalho, referindo-se ao material que compõe a mucilagem desta espécie. Este gel é utilizado popularmente em remédios caseiros, bebidas, além de ser amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Este gel contém polissacarídeos solúveis, onde a acemanana se destaca, mas também contém fibras insolúveis. Embora a literatura apresente diversos estudos à respeito de polissacarídeos solúveis de *Aloe barbadensis*, não há relatos sobre os polissacarídeos insolúveis presentes na parede celular.

Devido à inexistência de estudos sobre as fibras insolúveis de *A. barbadensis*, neste trabalho realizou-se a extração e caracterização de hemiceluloses desta espécie.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PLANTAS E MEDICINA

O uso de medicamentos à base de ervas remonta às tribos primitivas em que mulheres se encarregavam de extrair das plantas os princípios ativos para utilizá-los na cura de doenças (FRANÇA *et al.*, 2008). Hoje o comércio de plantas medicinais acontece amplamente no país, tanto no interior quanto em grandes cidades. O conhecimento popular a respeito da eficácia de plantas medicinais é relevante na divulgação de seus efeitos terapêuticos, prescritos com frequência, apesar de não terem seus constituintes conhecidos (MACIEL *et al.*, 2002). Muitas sociedades tradicionais ou autóctones possuem uma vasta farmacopéia natural, em boa parte proveniente dos recursos vegetais encontrados nos ambientes naturais ocupados por estas populações, ou cultivados em ambientes antropicamente alterados (AMOROZO, 2001).

As plantas medicinais tem sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente, sendo muitas substâncias utilizadas em medicamentos. A cultura chinesa tem-se utilizado do conhecimento popular de ervas medicinais há séculos, em contraste, grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos ou respaldo científico quanto a eficácia e biossegurança (FOGLIO *et al.*, 2006).

A pesquisa de plantas medicinais envolve investigação do conhecimento popular a respeito da eficácia de plantas através do isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos, investigação farmacológica dos extratos e dos constituintes químicos isolados, transformações químicas de princípios ativos, estudo da relação estrutura/atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (MACIEL *et al.*, 2002). O interesse acadêmico a respeito do conhecimento que estas populações detêm sobre plantas e seu uso tem crescido, após a constatação de que a base empírica desenvolvida por elas ao longo de séculos pode, em muitos casos, ter uma comprovação científica, que

habilitaria a extensão desses usos à sociedade industrializada (AMOROZO, 2001).

Plantas não são utilizadas apenas como fonte de compostos bioativos – tem importante papel na alimentação humana, sendo a principal fonte de vitaminas, sais minerais e fibras. A seguir, será feita uma breve explanação a respeito da importância das fibras, tendo em vista que estas são o foco deste trabalho.

## 2.2 FIBRA ALIMENTAR

A fibra alimentar é descrita como uma classe de compostos de origem vegetal que, quando ingeridos, são resistentes à hidrólise enzimática, à digestão e à absorção no intestino delgado, apresentando fermentação parcial no intestino grosso. Estes compostos de origem vegetal incluem polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e substâncias associadas (CERQUEIRA *et al.*, 2008; MASSIOT; ROUAU; THIBAUT, 1988). Existem dois tipos de fibras alimentares: as solúveis (pectinas, gomas, mucilagens, algumas hemiceluloses) encontradas nos legumes, cereais, leguminosas (feijão, ervilha, lentilha) e frutas, particularmente as cítricas e maçã; e as insolúveis (lignina, celulose, algumas hemiceluloses), presentes nos derivados de grãos inteiros, como os farelos, e também nas verduras (RIQUE; SOARES; MEIRELLES, 2002).

Polissacarídeos não amiláceos compõem a maior parte das fibras dietéticas e são conhecidos por possuírem importantes atividades nutricionais. O consumo das fibras dietéticas resulta em um aumento da proteção contra doenças degenerativas como diabetes, câncer intestinal e doenças cardiovasculares (ANNISON; CHOCT; CHEETHAM, 1992), e a recomendação de consumo é de 25-30 g por dia (VITOLO, 2008).

Fibras solúveis apresentam ação hipolipidêmica, e diversos mecanismos foram propostos para explicar a ação das fibras solúveis formadoras de géis, como as pectinas, na redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos e humanos. Visto que algumas fibras dietéticas podem diminuir as concentrações plasmáticas de colesterol, tem sido sugerido seu uso como agentes anti-aterogênicos. O mecanismo de ação das fibras não foi completamente elucidado, mas tem sido proposto que a diminuição das concentrações de colesterol se deve em parte à propriedade destas moléculas de inibir a absorção de lipídios e aumentar a síntese de ácido biliar, sendo que o segundo efeito citado se deve ao fato de que fibras solúveis aumentam a excreção fecal de ácidos biliares, fazendo com que o fígado remova colesterol do sangue para a síntese de novos ácidos biliares. Vários estudos têm sugerido que o colesterol sintetizado endogenamente seja o substrato preferido para a síntese de ácido biliar, e assim deixaria de estar disponível para aumentar a concentração de colesterol do corpo (BALSUBRAMAN; MITROPOULOS; MYANT, 1996; BJORKHE e DANÅ'LSS, 1985). Outro mecanismo proposto indica que as fibras solúveis sofrem fermentação no cólon produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Tem sido sugerido que o AGCC propionato, produto da fermentação das fibras solúveis por bactérias no cólon, pode inibir a síntese hepática de colesterol por inibir a atividade da HMG CoA redutase, a enzima limitante da síntese de colesterol (DIETARY FIBER, 1994; TRINIDAD *et al.*, 2006; NISHINÃ e FREEDLAND, 1990; RIQUE; SOARES, MEIRELLES, 2002; FIETZ e SALGADO, 1999; PIEDADE e CANNIATTI-BRAZACA, 2003).

O consumo de fibras também retarda a absorção dos nutrientes, causando a sensação de saciedade, o que diminui o consumo alimentar (PIEADADE e CANNIATTI-BRAZACA, 2003). No entanto apenas a fração de fibra solúvel tem efeito no metabolismo de lipídios, com propriedades hipocolesterolêmicas. Como exemplo, o farelo de aveia, goma guar, o psyllium (extraído da casca da semente de *Plantago ovata*) e a pectina (encontrada principalmente na laranja) (PIEADADE e CANNIATTI-BRAZACA, 2003; FIETZ e SALGADO, 1999)

Uma das fibras dietéticas a que se tem dado muita importância no combate à obesidade e por sua atividade hipocolesterolêmica é a forma desacetilada da quitina, chamada quitosana. Esta atividade, através da administração oral da quitosana, foi primeiramente relatada por SUGANO *et al.*, (1988) e vem sendo confirmada em vários estudos que têm demonstrado que a inclusão da quitosana na dieta de ratos alimentados com alto teor de gordura, promove a redução da concentração de colesterol plasmático total e a inibição da absorção de colesterol e triglicerídeos (CHEREM e BRAMORSKI, 2008)

Estudos epidemiológicos demonstraram associação inversa entre o consumo de dieta com fibras e o risco de morbidade e mortalidade por doenças coronarianas entre homens, e mortalidade por doenças isquêmicas do coração tanto em homens como em mulheres. Estudos adicionais demonstraram que populações com alta ingestão de fibras tem baixos níveis séricos de LDL, que pode ser, em parte, o efeito de algumas fibras dietéticas solúveis (DAVIDSON, *et. al*, 1998).

No entanto, não há muitos estudos sobre a atividade nutricional de fibras insolúveis, devido à dificuldade no isolamento e purificação do material em quantidade suficiente para experiências alimentares (ANNISON; CHOCT.; CHEETHAM, 1992).

A Tabela 1 apresenta um breve resumo dos principais tipos de fibras presentes em nossa alimentação.

Tendo em vista que o objeto de estudo deste trabalho são as fibras de *A. barbadensis*, será reportado a seguir uma breve apresentação da planta em questão, e em seguida, serão apresentados estudos referentes às suas propriedades medicinais.

TABELA 1: PRINCIPAIS FIBRAS PRESENTES NA ALIMENTAÇÃO

FIBRA	TIPO	DESCRIÇÃO
Celulose	Fibra alimentar e/ou funcional (Insolúvel)	Substância orgânica mais abundante na natureza e o componente mais comum das paredes celulares
Quitina e quitosana	Fibra alimentar e/ou funcional (Insolúvel/solúvel)	Quitina é um aminopolissacarídeo. Quitosana é o produto desacetilado da quitina. A primeira é encontrada na estrutura de artrópodes (carangueijos, lagostas) e na parede celular da maioria dos fungos
$\beta$ -glucanas	Fibra alimentar e/ou funcional (Solúvel)	São polissacarídeos encontrados em fungos, algas e plantas superiores (como cevada, centeio)
Gomas	Fibra alimentar e/ou funcional (Solúvel)	Consiste em um grupo de polissacarídeos isolados de sementes. São altamente viscosas e, por isso, utilizadas como espessantes e estabilizantes.
Hemicelulos	Fibra alimentar (Solúvel/insolúvel)	Polissacarídeo encontrado na camada externa das plantas. Esses polímeros consistem de glucose, arabinose, manose, xilose e ácido galacturônico
Inulina, oligofrutose, frutoligossacarídeo	Fibra alimentar e/ou funcional (Solúvel)	A maior parte da inulina e da oligofrutose disponíveis no comércio é sintetizada da sacarose ou extraída e purificada da raiz de chicória. Oligofrutose é também formada por hidrólise parcial da inulina
Lignina	Fibra alimentar e/ou funcional (Insolúvel)	É um polímero de fenilpropil álcool e ácidos e é encontrada na camada externa de plantas
Pectinas	Fibra alimentar e/ou funcional (Solúvel)	Encontrada na parede celular e nos tecidos intracelulares de muitas frutas
Polidextrose	Fibra funcional (Solúvel)	Polissacarídeo que é sintetizado pela polimerização de glucose e sorbitol
Psílio	Fibra funcional (Solúvel)	Componente de uma semente originária de Índia
Dextrina resistente	Fibra funcional (Solúvel)	Considerada o componente não-digerível após tratamento enzimático do amido
Amido resistente	RS <sub>1</sub> e RS <sub>2</sub> são classificados como fibras dietéticas, e RS <sub>3</sub> e RS <sub>4</sub> podem ser classificadas como fibras funcionais (Solúvel)	Ocorre na natureza, mas também pode ser produzido pela modificação do amido durante o processamento dos alimentos. Constitui parte do amido que não é digerível.

FONTE: VITOLO, 2008



## 2.3 GÊNERO ALOE

Mais de 400 espécies do gênero *Aloe* foram descritas, com diferentes tamanhos e em muitos habitats. Suas folhas podem ser mais ou menos suculentas e embora sejam típicas de savanas semi-áridas, também podem ser encontradas em desertos secos, penhascos e sob cachoeiras. As flores típicas da espécie variam em sua forma e cor, sendo estas o atrativo que chamou a atenção de exploradores, que as levaram da África para cultivo na Europa (REYNOLDS, 2004). *A. arborenses* e *A. saponaria* são utilizadas especialmente como plantas ornamentais, enquanto que *A. barbadensis* foi espalhada pelo mundo devidos às suas propriedades medicinais (REYNOLDS, 2004).

Todas as espécies do gênero *Aloe* são xerófitas, adaptadas fisiologicamente e estruturalmente para sobreviver em climas áridos, sendo típicas de clima tropical ou sub-tropical e nativas de regiões semi-tropicais da África do Sul (CHOW *et al.*, 2005; RODRÍGUEZ-GARCIA *et al.*, 2006; NEWTON, 2004). São plantas perenes, com folhas suculentas, sendo esta característica uma adaptação para que seja possível armazenar água, formando um tecido aquoso, consistindo de células com uma parede fina em que a água é envolvida por mucilagem, mas para isso ocorre um alargamento da folha da planta de modo que ela possa acomodar o tecido aquoso (NEWTON, 2004; VEGA, 2005).

### 2.3.1 *Aloe barbadensis* (nome popular: Aloe vera, aloe ou babosa)

Segundo o sistema de classificação botânica APG II (Grupo de Filogenia de Angiospermas), que faz classificação filogenética de angiospermas, *Aloe barbadensis* é classificada como angiosperma da família Asphodelaceae e gênero *Aloe* (STEVENS, 2001). É uma monocotiledônea pertencente à classe

Asparagales, dentro do grupo das monocotiledôneas-base (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003).

Suas folhas são constituídas externamente por uma cutícula, ou seja, uma cobertura de cera produzida pelas células epidérmicas, cuja função é proteger a planta da desidratação (NEWTON, 2004). Abaixo desta encontra-se a epiderme, o tecido de revestimento que cerca o mesófilo, onde podem ser diferenciadas as células do colênquima (tecido de sustentação) e uma fina parede celular que constitui o parênquima. As células do parênquima produzem uma substância transparente, conhecida como “gel de babosa” ou “gel de aloe”, que é utilizado na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia (Figura 1) (FEMENIA, 2003; MIRANDA, 2009).

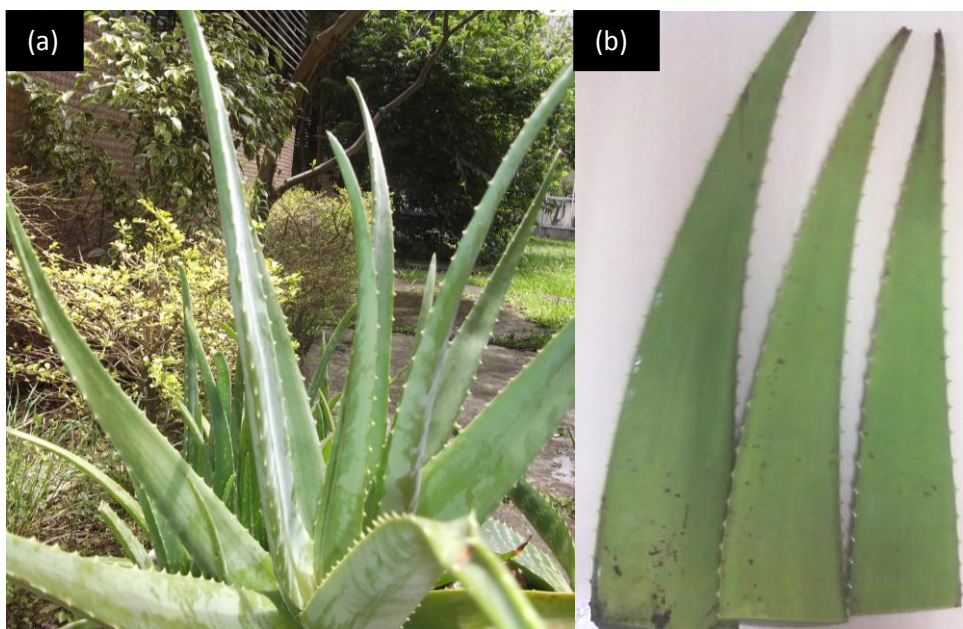


FIGURA 1: FOTO DE (a) *Aloe barbadensis* e da (b) FOLHA DE *Aloe barbadensis*

Fonte: O Autor

*A. barbadensis* contém também o exsudato - um látex amarelo que é extraído dos feixes vasculares que ficam na junção entre a casca e os filetes (CHOW *et al.*, 2005; NEWTON, 2004; BOZZI, 2007; FEMENIA *et al.*, 2003; VEGA, 2005).

### 2.3.2 Uso de *Aloe barbadensis* (babosa)

Plantas da espécie *A. barbadensis* há séculos tem sido consumidas com fins medicinais para queimaduras, lacerações de úlceras pépticas, dermatite, pressão arterial elevada, queda de cabelo (CHOW *et al.*, 2005 ), além de ser utilizada em cosméticos e na indústria alimentícia devido às suas propriedades aromáticas e outras atividades farmacológicas, como emoliência, redução da inflamação e cicatrização de feridas (ZONTA *et al.*, 1995), antiinflamatório, anti-câncer, anti-diabetes e na ativação de macrófagos (WU *et al* 2006), analgésico, atividade antimicrobiana e inseticida (SALEEM *et al.*, 1996).

Suas propriedades medicinais e atividades fisiológicas tem sido confirmadas em diversos estudos, comprovando sua eficácia. No entanto, os componentes ativos responsáveis por essas atividades não tem sido identificados, de modo que seus alvos bioquímicos não são claros (REYNOLDS, 2004).

Tradicionalmente, o gel de *Aloe in natura* é utilizado tanto topicamente (em feridas, queimaduras leves e irritações na pele) como internamente para tratar constipação, tosse, úlcera, diabetes, dor de cabeça, artrite e deficiências do sistema imune. O mesmo gel é frequentemente comercializado como pó concentrado (BOZZI *et al.*, 2007).

Seu uso na indústria compreende diversos produtos, como loção pós barba, colutório, tônicos para cabelo e shampoo, sabonete, além da aplicação alimentícia como bebida e em outros produtos. Devido a sua popularidade como planta medicinal, uma série de estudos foram realizados relatando os efeitos medicinais da mesma. A próxima sessão trará um breve relato de alguns estudos realizados com metabólitos de *A. barbadensis*.

### 2.3.3 PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARÍDEOS DE *A. barbadensis*

A acemanana é considerada a principal substância ativa de Aloe, e está localizada dentro dos protoplastos das células. É um polissacarídeo linear composto de uma longa cadeia de  $\beta$ -D-manose (1 $\rightarrow$ 4)-ligada acetilada em C-2 ou C-3 (CHOW *et al.*, 2005; NEWTON, 2004; BOZZI, 2007; FEMENIA *et al.*, 2003; VEGA, 2005; PUERTO *et al.*, 2006). A acemanana é capaz de estimular a proliferação de células do timo e é efetiva no tratamento de fibrosarcoma em cães, gatos e ratos, com aumento da sobrevivência. O efeito antitumoral das acemananas pode ocorrer devido ao estímulo da produção do fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 e interferon por macrófagos, além de ser capaz de tratar infecções virais (MASCOLO, *et al.*, 2004). Acemananas também estimulam o crescimento de macrófagos, linfócitos, células NK (*natural killer*), bem como produção de interferon e citocinas (MOTYKIE *et al.*, 2004).

Acemananas apresentam atividade anti-viral, atuando como adjuvante no tratamento do HIV/AIDS. Este polissacarídeo aumenta a produção e função das células T citotóxicas. A acemanana utilizada em combinação com o AZT protege as células da rápida replicação de HIV-1, que causa morte celular prematura (MASCOLO *et al.*, 2004).

A glucomanana é um heteropolissacarídeo que apresenta uma estrutura química composta de D-manose e D-glucose (relação de 8:5) unidas por ligações  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), assim como acemanana (VEGA, 2005). É uma fibra muito solúvel que possui uma grande capacidade de captar água, formando soluções muito viscosas. Possui alto peso molecular e uma viscosidade elevada, demonstrando-se eficaz no combate à obesidade, pela produção da sensação de saciedade, além de aumentar o volume fecal e diminuir os níveis de glucose e insulina, provavelmente devido ao esvaziamento gástrico lento e por dificultar o acesso da glucose à mucosa intestinal (VEGA, 2005).

Glucomananas presentes em *A. barbadensis* tem atividade imunoestimulante e mesmo isoladas tem atividade proliferativa em células,

imunoestimulante e anti-inflamatória. As mananas são capazes de estimular células T e ativar macrófagos a produzir óxido nítrico e citocinas, aumentando o número de monócitos e macrófagos em circulação; possui atividade antibacteriana e antiviral (BOZZI *et al.*, 2007; MASCOLO *et al.*, 2004; MOTYKIE *et al.* 2004).

CAPÓ *et al.*, (2008), estudaram o efeito do extrato aquoso de *Aloe vera* sobre indicadores lipídicos em ratos com hiperlipidemia aguda induzida por tritón, e observaram a redução significativa dos níveis de colesterol total, LDL colesterol e triglicerídeos, sem modificação no nível de HDL colesterol, demonstrando um efeito hipocolesterolêmico.

Ação hipoglicêmicas tem sido estudadas em modelos animais e em humanos, e há a hipótese de que *Aloe* pode estimular a liberação ou síntese de insulina pelas células beta do pâncreas. Em um estudo, 72 mulheres diabéticas foram divididas em 2 grupos e receberam *Aloe* ou placebo por 42 dias. Observou-se redução dos níveis de glucose de 250 para 141mg/dl no grupo que recebeu *Aloe* (MASCOLO *et al.*, 2004).

AKINMOLADUN e AKINLOYE (2007) testaram o efeito hipoglicemiante de *Aloe* em coelhos dividindo-os em 4 grupos. No primeiro grupo foi administrado um indutor de hiperglicemia, no segundo o indutor de hiperglicemia e suco caseiro de *A. barbadensis*, no terceiro junto ao hiperglicemiante suco industrializado de *A. barbadensis* e o quarto grupo não recebeu nenhum tratamento especial, sendo o controle. Como resultado, tanto o grupo 2 como o grupo 3 apresentaram redução dos níveis glicêmicos, no entanto este foi mais pronunciado no grupo 2, que recebeu o suco caseiro.

*Aloe* possui propriedades laxativas e tem sido utilizado tradicionalmente no tratamento de constipação. Esta prática é baseada na presença de antraquinonas, como barbalóina, que é metabolizada a *Aloe-emodina*, isobarbalóina e ácido crosofanico, que são laxativos (MASCOLO *et al.*, 2004).

O gel de *Aloe* contém também pequenas quantidades de ácido salicílico, além de emodina, emolina e barbalóina, que possuem atividade anti-inflamatória. Sugere-se que este efeito ocorra devido a inibição de

prostanóides (que incluem prostaglandinas, prostaciclina, e os tromboxanos) ou mecanismos alternativos como inibição da infiltração de leucócitos polimorfonucleares e inibição da formação da histamina (MASCOLO *et al*, 2004).

A atividade anti-viral deriva de vários compostos presentes na planta, como a presença de antraquinona, que inibe várias viroses *in vivo*, incluindo o vírus da herpes, varicela e influenza (MASCOLO *et al*, 2004).

Tendo em vista que os polissacarídeos são os responsáveis por diversas propriedades terapêuticas de *A. barbadensis* e são o objeto de estudo deste trabalho, a seguir será descrita uma breve explanação a respeito dos polissacarídeos presentes em paredes celulares de vegetais superiores, com um enfoque especial para parede celular de vegetais pertencentes ao grupo das angiospermas monocotiledôneas, o mesmo de *A. barbadensis*.

## 2.4 PAREDE CELULAR

A parede celular é um compartimento dinâmico que muda com o decorrer da vida da célula. A parede celular primária surge durante a divisão celular e aumenta rapidamente a área de superfície durante a expansão da célula, em alguns casos mais de cem vezes. A lamela média forma a interface entre as paredes primárias de células vizinhas. Na diferenciação, muitas células desenvolvem por dentro da parede primária uma parede celular secundária (Figura 2) (BUCHANAN *et al.*, 2001; O'NEILL e YORK, 2003; CARPITA e McCANN, 2000).

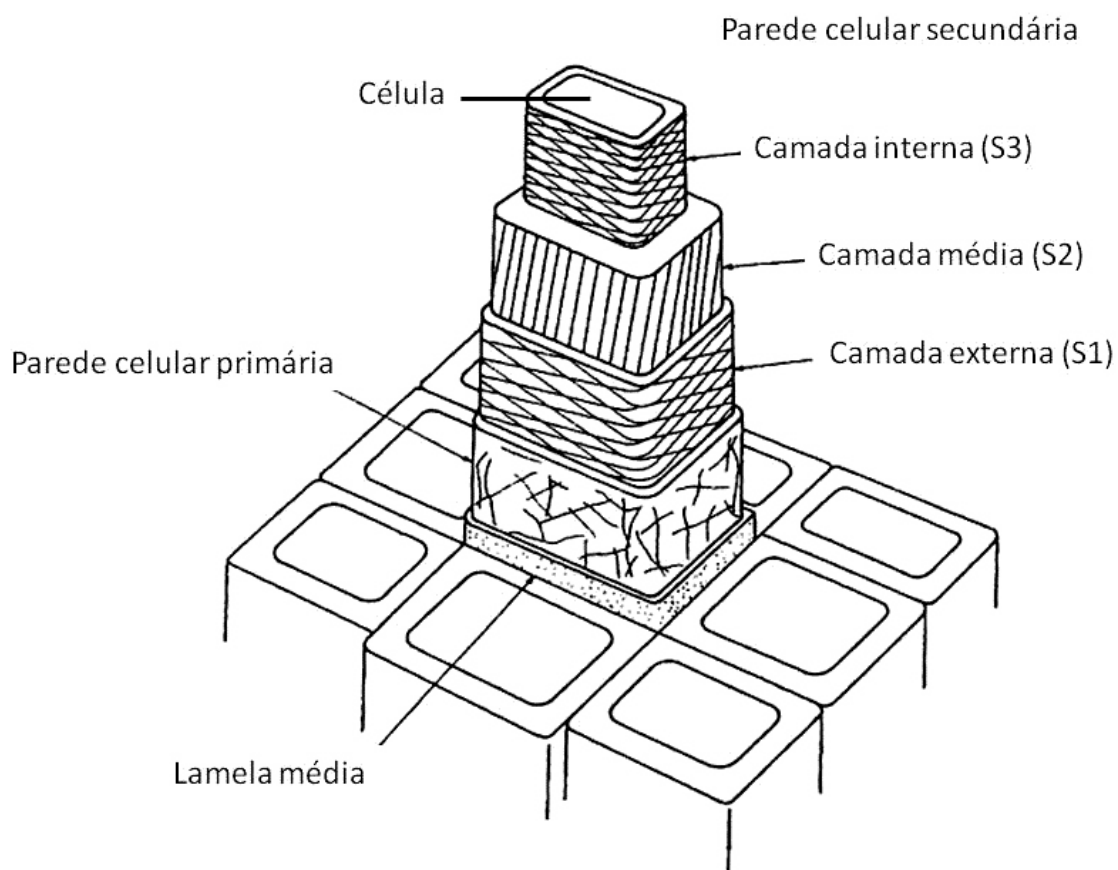


FIGURA 2: ESQUEMA DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

FONTE: HARRIS, 2006

A composição molecular da parede celular difere entre espécies, entre tecidos, entre células individuais, e entre cada região da parede ao redor de um único protoplasma (BUCHANAN *et al.*, 2001). Todavia, todas as paredes celulares tem uma estrutura básica comum. Elas consistem de uma fase fibrilar feita de microfibrilas de celulose em uma matriz de polissacarídeos não celulósicos, que inclui pectinas, hemiceluloses, glicoproteínas e compostos fenólicos (ANGONE *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2006). As proporções e as estruturas destes polissacarídeos não-celulósicos podem variar com o tipo de células vegetais e espécie. A celulose é o principal componente da parede celular, compondo 15 a 30% da massa seca da parede celular primária e está presente em maior porcentagem na parede celular secundária (SUN *et al.*, 2006).

A parede celular tem função estrutural (POPPER e FRY, 2003), tem um papel no controle do crescimento das células e no processo morfogênético, e atua como barreira contra patógenos. Algumas células contêm moléculas que afetam padrões de desenvolvimento e marcam a posição da célula dentro da planta. As paredes possuem moléculas sinalizadoras que participam da comunicação entre células e entre a parede e o núcleo. Fragmentos de polissacarídeos de paredes celulares podem promover a secreção de moléculas de defesa e a parede pode ser impregnada com proteína e lignina como proteção contra patógenos como fungos e bactérias. A parede celular também participa do reconhecimento de bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio (BUCHANAN *et al.*, 2002), ativa genes responsáveis pela síntese de fitocompostos, como fitoalexinas, participa da comunicação entre as células, e atividades como absorção, transporte e secreção de substâncias entre as células do vegetal, que são dependentes da parede celular (BOWLES, 1990; BRETT e VALDRPN, 1990).

#### 2.4.1 Parede celular primária

A parede celular primária (PCI) é a primeira a ser formada, enquanto a expansão celular está parada. Esta parede é forte apesar de fina e flexível, tendo capacidade plástica e elástica. A PCI tem importante papel no metabolismo das plantas, por exemplo: atua como precursor de oligossacarinas, que são oligossacarídeos que atuam como hormônios; participa da coesão dos tecidos; defesa; troca iônica; regulação da expansão celular; tem também um papel crítico no balanço da força osmótica em células vivas, prevenindo o rompimento e permitindo o crescimento controlado; controla o desenvolvimento morfológico de células de plantas individuais; regula o crescimento da planta, determinando a razão e a direção da expansão



celular, definindo a forma e o tamanho da célula (FRY, 2004; POPPER e FRY, 2003; HOFFMAN *et al.*, 2005).

A PCI é composta de pectinas, hemiceluloses e celulose, sendo que a celulose está embebida na matriz de pectinas e hemiceluloses. Estas moléculas estão ligadas de forma que interagem umas com as outras em ambiente aquoso. Algumas das ligações cruzadas envolvem ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio entre celulose e hemicelulose, galacturonanas possuem ligações cruzadas entre si com pontes de  $\text{Ca}^{2+}$ , e glicoproteínas são ligadas ionicamente a polissacarídeos ácidos. Encontra-se também na PCI ligações covalentes, alguns polissacarídeos são acoplados oxidativamente a cadeias laterais fenólicas ou resíduos de tirosina (FRY, 2004; HOFFMAN *et al.*, 2005).

Os mais abundantes polissacarídeos hemicelulósicos na PCI da maioria das plantas vasculares são as xiloglucanas, que são sintetizadas no aparelho de golgi e exportadas para o apoplasto de forma solúvel. Xiloglucanas ligam-se espontaneamente e avidamente à superfície das microfibrilas de celulose e por meio desta, são incorporadas à rede de xiloglucana/hemicelulose, estrutura da parede celular primária de plantas superiores (HOFFMAN *et al.*, 2005).

CARPITA e GIBEAUT (1993) propuseram um modelo de parede celular primária de angiospermas baseado nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécnicos e a hemicelulose principal. A parede celular primária do tipo I está presente na parede de dicotiledôneas em geral e algumas monocotiledôneas (não comelinóides), enquanto que a parede celular primária do tipo II corresponde à parede das Poaceas (gramíneas) e engloba a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides)

Ambas as PCI (tipo I e II) e a parede celular secundária serão apresentadas na sequência.

#### 2.4.1.1 Parede celular primária do tipo I

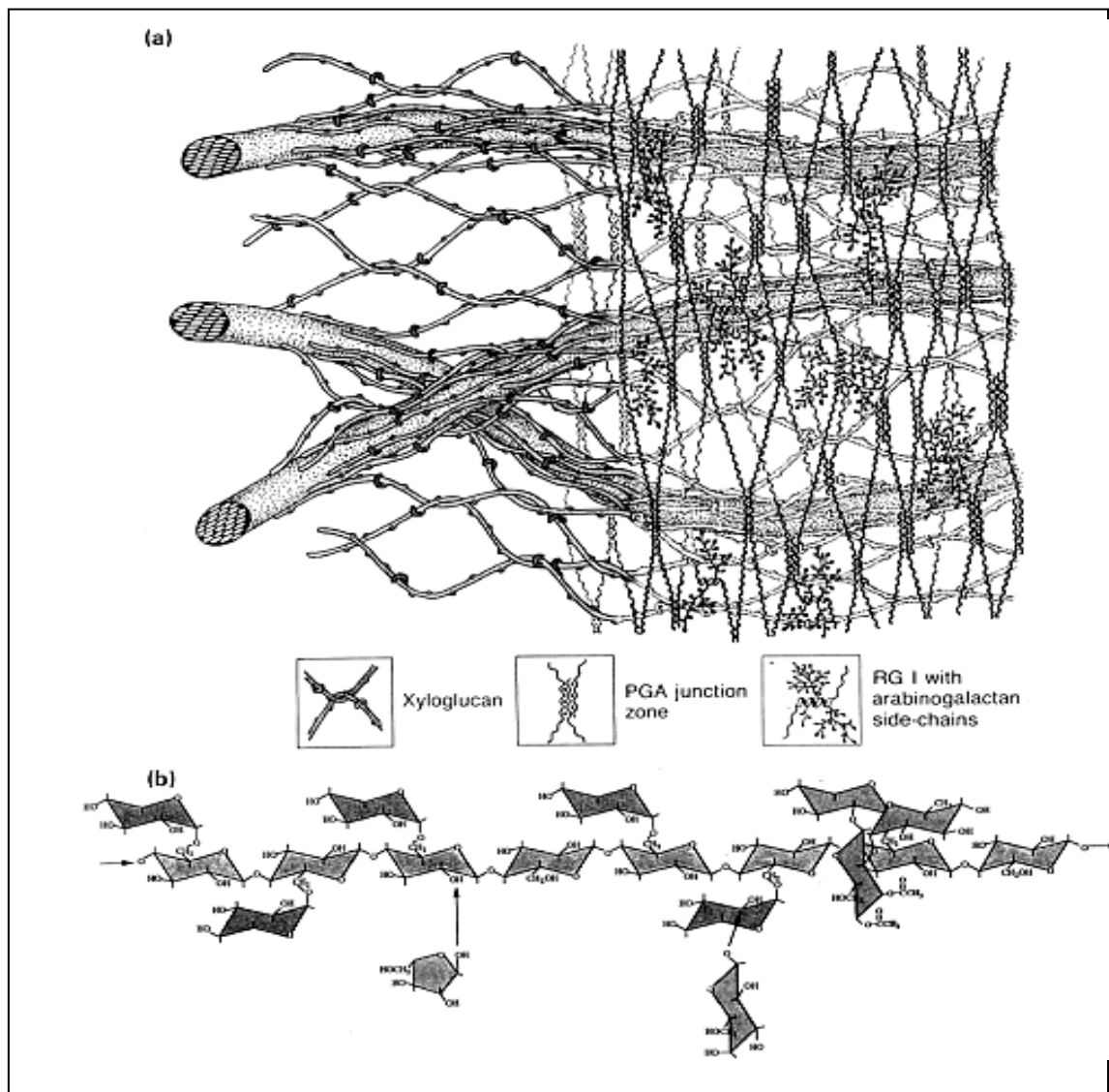
A PCI do tipo I é composta de uma rede de fibras de celulose entrelaçadas com xiloglucanas, formando uma rede celulose-urônicoxiloglucana, a qual compreende 50% da parede celular. As xiloglucanas ligam-se firmemente as microfibrilas de celulose e são longas o suficiente para estender-se e ligar duas microfibrilas. Xiloglucanas estão presentes na mesma quantidade de celulose, e há outros polissacarídeos hemicelulósicos em menor quantidade, como galactoglucomananas, galactomananas, (1→3)-β-D-glucanas e arabinoxilanas, além de grande quantidade de proteínas estruturais, sendo a principal a extensina, a qual pode interagir com os polissacarídeos (Figura 3) (CARPITA e MCCANN, 2000).

Esta rede de celulose-xiloglucana está embebida por uma matriz de pectina (20-35%), a qual controla, entre outras propriedades fisiológicas, a porosidade. Esta é composta basicamente de ácidos poligalacturônicos, que são homopolímeros helicoidais de (1→4)-α-D-ácido galactosilurônico (GalA) e ramnogalacturonana (RGII), que são contorcidos ao redor de heteropolímeros de unidades dissacarídicas de (1→2)-α-L-ramnosil-(1→4)-D-GalA. A pectina atua como fonte de oligossacarídeos bioativos. Por exemplo, foi reportado que oligogalacturonídeos de homogalacturonanas tem papel importante na regulação do crescimento celular da planta e indução de fitoalexinas (KAKEGAWA; EDASHIGE; ISHI, 1998; CARPITA e GIBEAUT, 1993).

A celulose, hemicelulose e pectinas estão ligadas de forma que se mantêm apoiados uns nos outros em ambiente aquoso. Ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio entre celulose e hemicelulose, galacturonanas possuem ligações cruzadas entre si com pontes de  $\text{Ca}^{2+}$ , e glicoproteínas são ligadas ionicamente a polissacarídeos (FRY, 2004).

Um terceiro domínio independente são as proteínas estruturais, que determinam a porosidade da parede, fornecem cargas em sua superfície que modulam o pH da parede e o balanço de íons, e servem como moléculas de

reconhecimento que sinalizam o desenvolvimento de respostas apropriadas a organismos simbióticos, patógenos e insetos.



a) Representação de microfibrilas de celulose interlaçadas com polímeros de xiloglucanas, ambos mergulhados em uma matriz de polissacarídeos pecticos

b) Unidade estrutural de xiloglucanas em parede celular primária do tipo I.

FIGURA 3: ESQUEMA DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I DE DA MAIORIA DAS PLANTAS FLORESCENTES (ANGIOSPERMAS)

FONTE: CARPITA E GIBEAUT, 1993

#### 2.4.1.2 Parede celular primária do tipo II

Na parede celular primária do tipo II as microfibrilas de celulose estão interligadas às glucuronoarabinoxilanas, as quais constituem a principal hemicelulose (CARPITA e McCANN, 2000). Há também xilanas, cadeias lineares de xilose em ligação  $\beta(1\rightarrow4)$ , sendo substituídas por unidades de arabinose, que bloqueiam as pontes de hidrogênio (CARPITA e GIBEAUT, 1993). Em geral, a parede tipo II possui menor proporção de pectina (10%), porém o aumento da densidade de carga ocorre devido à presença das unidades de ácido glucurônico da hemicelulose. A quantidade de proteínas estruturais também é menor na parede tipo II, entretanto estas apresentam compostos fenólicos que participam na formação de ligações cruzadas entre oligossacarídeos (CARPITA e McCANN, 2000). A constituição da parede celular muda durante a expansão celular. Algumas arabinanas são encontradas durante a expansão, mas não são sintetizadas nesse momento, sendo que  $\beta$ -glucanas  $(1\rightarrow3)$   $(1\rightarrow4)$  ligadas são então sintetizadas (Figura 4) (CARPITA e GIBEAUT, 1993).

#### 2.4.2 Parede celular secundária

A parede celular secundária encontra-se entre a parede primária e a membrana da célula, conferindo rigidez ao tecido. A formação da parede secundária acontece após a lignificação, o qual interrompe o crescimento celular e indica, portanto, o amadurecimento celular e a diferenciação terminal da célula. A constituição desse tipo de parede em dicotiledôneas, passa a ser de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e traços de pectina (ALBERSHEISEIM *et al.*, 1996; AVIGAD e DEY, 1997).

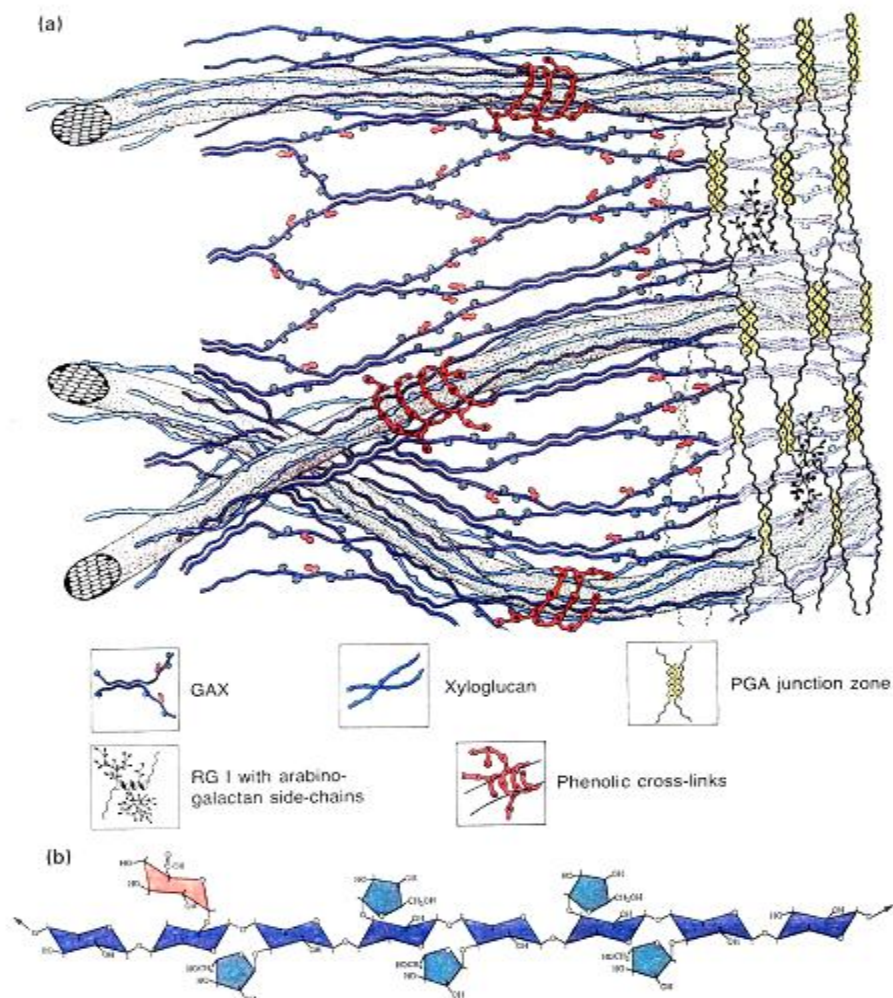


FIGURA 4: ESQUEMA DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA TIPO II

a) Representação de um único estrato de microfibrilas após divisão celular. As microfibrilas são interligadas por glucuronoarabinoxilanas. A xilose é uma glucose sem seu C-6, e com ligações  $\beta(1\rightarrow4)$  produzindo uma cadeia linear. Diferentes de xiloglucanas, as xilanas são substituídas com unidades de arabinose que bloqueiam as ligações de hidrogênio. As xilanas são provavelmente sintetizadas em uma forma altamente substituída, e as unidades são clivadas no espaço extracelular para render fragmentos de xilanas que podem se ligar em qualquer face da celulose. A porosidade do domínio GAX poderia ser determinada pela extensão da remoção das unidades pendentes. Algumas GAX altamente substituídas continuam a ser intercaladas com pequenas quantidades de pectinas que também se originam na parede primária. Diferente do tipo I de parede, uma substancial porção dos polímeros não-celulósicos são "ligados" em microfibrilas por ligações fenólicas resistentes à álcalis.

b) Uma unidade de estrutura de glucoarabinoxilana (GAX) altamente substituída

FONTE: CARPITA E GIBEAUT, 1993

Os polissacarídeos de parede celular tem sido frequentemente considerados indicadores taxonômicos (BOCHICCHO e REICHER, 2003), e variam consideravelmente de acordo com o tipo de tecido, sendo que a comparação entre os polissacarídeos de cada grupo pode ser útil à compreensão das propriedades da parede celular.

#### 2.4.3 Parede celular de angiospermas

A parede celular de angiospermas tem uma estrutura bifásica consistindo de um esqueleto rígido de microfibrilas de celulose unidas por um gel como matriz, constituída de polissacarídeos não-celulósicos (principalmente de polissacarídeos pécticos e xiloglucanas) e glicoproteínas. A maioria desses biopolímeros são solúveis e altamente hidratados, no entanto a matriz da parede é insolúvel em água e muito consistente (FRY, 1986; BOOTTEN *et al.*, 2008; STEVENS, 2001).

Os polissacarídeos formam uma rede composta de microfibrilas de celulose e xiloglucanas e outra composta de polissacarídeos pécticos. Uma terceira rede, da proteína extensina, também pode estar presente (BOOTTEN *et al.*, 2008).

Angiospermas também possuem arabinoxilanas - arabino (4-O-metilglucurano) xilanas – sendo que a proporção de xilose:arabinose é de 7:1 a 12:1 e xilose:ácido urônico é aproximadamente 5:1 a 6:1 (NORTHCOTE, 1972). Segundo FRY (1986), em monocotiledôneas a maior parte das hemiceluloses são arabinoxilanas ácidas e glucanas neutras  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3, 1 $\rightarrow$ 4). As arabinoxilanas são substituídas com ferulato, *p*-coumarato, e *p*-hidroxibenzoato. A parede celular primária consiste de 20-30% de celulose, 25% de hemicelulose, 30% de pectina e 5-10% de glicoproteína. Pectinas tornam a parede elástica e junto com glicoproteínas e hemiceluloses, formam a matriz onde a celulose está incorporada. Quando a célula alcança seu tamanho e

forma final, outra camada, a parede celular secundária, que consiste principalmente de celulose, é adicionada à parede celular primária. As microfibrilas da parede secundária são arranjadas em camadas (HELDT, 2004).

Xilanas são hemiceluloses abundantes na parede celular de angiospermas mono- e dicotiledôneas. São estabelecidas durante o crescimento da parede celular e formam o volume da fração hemicelulósica em angiospermas. Geralmente a estrutura das xilanas em plantas superiores é de cadeias de resíduos de D-xilopirranose com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Xilanas são grandes moléculas com grau de polimerização de aproximadamente 150-200. Nas angiospermas estas são unidades de 4-O-metil-D-ácido glucurônico que se ligam a cadeia principal de xilose por ligações  $\alpha$ (1 $\rightarrow$ 2), e provavelmente são distribuídos aleatoriamente ao longo da cadeia. Eles ocorrem na proporção de cerca de um radical de ácido urônico a cada dez resíduos de xilose, e estão presentes em grande parte como ésteres e não como ácidos livres. *In vivo*, cerca de metade dos grupos de xilose estão acetilados, sendo que estes podem estar em C-2, C-3 ou C-2 e C-3. Quando as xilanas acetiladas são isoladas, podem ser solúveis em água, especialmente em comparação com o polímeros desacetilados resultantes de extração alcalina. A presença de numerosos grupos acetil evitam o alinhamento das cadeias moleculares, e conseqüentemente a agregação molecular, o que demonstra que a presença de grupos acetil influencia a associação das cadeias na parede celular (REICHER, F.; CORRÊA, 1982; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C; GORIN, 1984; NORTHCOTE, 1972).

Angiospermas contém também glucanas, xiloglucanas e mananas. Mananas é um nome genérico para uma família de polissacarídeos que consiste de 4 subfamílias, glucomananas, galactomananas, galactoglucomananas e mananas linerares contendo menos de 5% de galactose. Em glucomananas e galactoglucomananas a cadeia linear consiste de D-manose e D-glucose em ligação  $\beta$ (1 $\rightarrow$ 4). Galactomananas podem ser muito substituídas com galactose, contendo quase 20% de substituição (PETKOWICZ *et. al*, 2001; REID; EDWARDS, 1995; MABUSELA *et al.*, 1990).

Xiloglucanas de monocotiledôneas não contém fucose terminal, e pouca xilose e galactose terminais. Além disso, a xiloglucana de monocotiledôneas possui poucos resíduos de xilose substituídos (HAYASHI, 1989).

Segundo BIAN *et al.* (2010) a composição de hemicelulose em angiospermas e gimnospermas é diferente, sendo que em gimnospermas predominam glucuronoxilanas, enquanto que as angiospermas contém principalmente galactoglucomanas .

## 2.5 HEMICELULOSES

Hemicelulose é um grupo de polissacarídeos complexos ramificados de baixo peso molecular que são biosintetizados em grande quantidade em muitas árvores e plantas terrestres. É a mais abundante família de biopolímeros (XU *et al.*, 2006), compreendendo um-terço a um-quarto da matéria orgânica das plantas sendo que sua quantidade irá variar de acordo com a espécie, e está presente tanto na parede celular primária quanto na secundária (PENG *et al.*, 2008).

Estes polissacarídeos normalmente ocorrem junto com celulose em tecidos de plantas (GABRIELII, 2000) e são definidos como material solúvel em álcali após a remoção de substâncias pécticas (XU *et al.*, 2006). Hemiceluloses são a segunda classe de polissacarídeos hidrofílicos mais abundante da natureza, e apresentam um menor grau de polimerização do que a celulose (PENG *et al.*, 2008; SUN *et al.* 2002; LUNDQVIST *et. al.*, 2002). Estão localizadas principalmente na parede celular secundária e atuam junto com a celulose e a lignina no suporte mecânico e propriedades de transporte.

O interesse industrial nesses polímeros tem crescido, visto que tem diversas aplicações, tais como nas indústrias farmacêuticas, químicas e alimentícias. Suas moléculas contém entre 70 e 200 unidades monossacarídicas, e consistem principalmente de D -manose, D -xilose, D-glucose, L-arabinose, D-galactose a ácido 4-O-metil- $\alpha$ -D-glucurônico.



Hemiceluloses formam ligações de hidrogênio com a celulose e são fortemente ligadas a lignina por vários tipos de ligação. Xilanas são as hemiceluloses mais abundantes (BIAN *et al*, 2010; LUNDQVIST *et. al*, 2003).

É também notável que uma grande proporção de grupos hidroxil são ligados em ligações de hidrogênio intra e intermolecular, e algumas dessas ligações de hidrogênio ligam água naturalmente a moléculas de celulose. Esse caráter hidrofílico dificulta o desenvolvimento de materiais à base de hemicelulose. Modificações químicas tem sido investigadas como caminho para a produção de materiais a prova de água (PENG, 2008).

Extração de hemicelulose geralmente é feita através de extração alcalina, no entanto, no caso de hemiceluloses acetiladas os grupos O-acetil são removidos por hidrólise. Hemiceluloses acetiladas podem ser extraídas com solvente orgânico, como Me<sub>2</sub>SO. Hemiceluloses acetiladas parcialmente despolimerizadas podem ser isoladas por extração aquosa seguida de tratamento a vapor ou em microondas (JACOBS *et al*, 2002)

A maioria das hemiceluloses de parede celular de resíduos de culturas são arabinoxilanas ou arabino-4-O-metilglucuronoxilanas. A cadeia principal é de resíduos de D-xilopirranose ligados  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), que podem ser substituídos em C-2 e ou C-3 por cadeias pequenas e flexíveis de resíduos de L-arabinofuranose e ácido D-glucurônico (ou seus derivados 4-O-metil) em uma unidade de sinal (PENG, 2008).

Em adição, tem sido identificados na estrutura macromolecular de hemiceluloses, galactose, glucose, e ramnose próximos a grupos acetil, e ácidos fenólicos como ácido ferúlico e ácido *p*-coumárico. Deve-se notar que uma grande proporção de grupos hidroxil são engajados nas ligações de hidrogênio intra e intermolecular, e alguns deles são ligados a moléculas de água, naturalmente presas na estrutura das hemiceluloses (PENG, 2008).

Polissacarídeos ricos em manose, junto com fucogalactoxilana e xilana, são também componentes da parede celular primária (KUBAČKOVÁ *et.al*, 1992).

Apesar de ser uma enorme fonte renovável que não é aproveitada (XU *et al*, 2006), pesquisas tem sido realizadas para sua utilização, como o uso de xilanas na formação de material termoplástico ou como formador de gel, como enchimento para prolipropileno, na formulação de tintas, e como revestimento para fibras celulósicas (XU *et al*, 2006).

A natureza hidrofílica da hemicelulose é a maior restrição para o desenvolvimento de materiais (PENG, 2008). No entanto, suas propriedades podem ser modificadas por hidrólise parcial, oxidação, redução, eterificação ou esterificação dos grupos hidroxil (FANG *et al.*, 2000). Esterificação com grande quantidade de cloretos de ácidos graxos é conhecida por resultar em materiais termoplásticos e hidrofóbicos. Entretanto, a preparação de polímeros hidrofóbicos de vários polímeros hemicelulósicos, através de eterificação ou esterificação, de grupos hidroxil tem recebido pouca atenção em comparação com celulose ou amido (PENG, 2008), que tem sido utilizados na indústria de alimentos, têxtil, papel e cosméticos (FANG *et al.*, 2000).

A pesquisa de hemiceluloses tem se concentrado no estudo das xilanas, estudando os procedimentos de extração para um potencial comercial de produção de hemiceluloses poliméricas. Entretanto as hemiceluloses isoladas diretamente de biomassa contém notável quantidade de ligações à lignina e celulose da parede celular, limitando sua utilização industrial, visto que é difícil de separá-las sem significativa modificação de sua estrutura (SUN *et al.* 2002; BRIENZO *et al.*, 2009).

Foi reportado que hemiceluloses carboximetil-modificadas podem ser usadas como uma droga anti-tumor em que a hemicelulose modificada aumenta a imunidade celular por intensificar o número e a atividade dos imunócitos. Outro estudo sobre crosslinking, cianoetilação e oxidação de hemiceluloses demonstrou possibilidade de geração de produtos com diferentes capacidades de troca de íons, ou como aglutinante para fabricação de papel (SUN *et al*, 1999).

Além desses polímeros, a xilose recuperada da hidrólise ácida pode ser convertida a xilitol, um produto especializado altamente valorizado, via hidrogenação enzimática ou catalítica (XU *et al*, 2006).

Em produtos farmacêuticos, pode ser útil na fabricação de comprimidos, no tratamento de feridas e prevenção de coagulação sanguínea (XU *et al.*, 2006). Vários estudos sobre a utilização das hemiceluloses demonstram seu potencial de fermentação para produção de etanol, acetona, butanol e xilitol (FANG *et al.*, 2000). Sun e Sun, 2002, propõem a produção de hemicelulose em larga escala, com peróxido alcalino, que é usado na indústria de papel e para branquear polpas ricas em lignina.

Hemiceluloses são conhecidas como valiosos aditivos em polpa, barreira natural para filmes de empacotamento, e como componente substituto de pele em casos de danos nas camadas superficiais da epiderme (BRIENZO *et al.*, 2009).

Diferentes esquemas de isolamento fracional tem sido propostos na literatura, de modo que o método deve ser escolhido de acordo com a planta de origem. Esse tipo de abordagem minimiza as transformações dos componentes da parede celular decorrentes de seu isolamento, permite análise quantitativa simultânea de hemiceluloses, lignina, e complexos de carboidrato-lignina. (BIKOVA e TREIMANIS, 2002). Entre os tratamentos que tem sido aplicados na extração da hemicelulose, o calor tem sido combinado com a adição de produtos químicos como álcali, ácido ou peróxido de hidrogênio. Peróxido alcalino é um agente efetivo tanto para deslignificação como para solubilização de hemiceluloses. Nessas condições há menos danos na estrutura do carboidrato e a deslignificação é mais efetiva. (BRIENZO *et al.*, 2009)

O isolamento de hemiceluloses envolve hidrólise alcalina de ligações éster para liberá-la da matriz de lignocelulose permitindo sua extração em meio aquoso. No entanto, extensivas ligações de hidrogênio entre polissacarídeos individuais com a parede celular podem impedir o isolamento do componente hemicelulósico. Isso acontece especialmente na presença de metais como manganês, ferro e cobre (SUN *et al.*, 2005).

Dependendo da sequência de extração, hemiceluloses são classificadas como hemiceluloses A, B e C, que variam em sua composição de açúcar, propriedades físicas e funcionais (REVANAPPA *et al.*, 2010). A neutralização

dos extratos de hemicelulose pode levar à precipitação de parte do material (hemicelulose A) deixando em solução hemicelulose B. As soluções alcalinas utilizadas na extração de hemiceluloses contém  $\text{NaBH}_4$  (agente redutor) para evitar reações de degradação.

### 2.5.1 Xilanas

Xilanas são as hemiceluloses mais abundantes e contém uma cadeia principal formada por unidades de D-xilose ligadas  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) que usualmente são substituídas por unidades de xilopirranose e arabinofuranose na posição 3, e grupos O-acetil, e também pode estar substituída por GlcA e/ou 4-O-metil-GlcA em O-2 a cada 6-12 resíduos de xilose (BIAN *et al*, 2010; XU *et al*, 2006; PENG *et al*, 2008; SAGHIR *et al*, 2008; REICHER, F.; CORRÊA, 1982).

Xilanas tem demonstrado ter diferentes aplicações, por exemplo, na fabricação de biopolímeros catiônicos, hidrogéis e longas cadeias de alquil ésters derivados (LUNDQVIST *et. al*, 2003) termoplástico derivado de xilanas (JACOBS *et al*, 2003) .

### 2.5.2 Xiloglucanas

Xiloglucana é o mais abundante polissacarídeo hemicelulósico na parede celular primária de dicotiledôneas, compreendendo 20-25% do peso seco. Também está presente na parede celular secundária, sendo 2-5%. Xiloglucanas também foram encontradas em gimnospermas. Além de ser um componente importante da parede celular primária, xiloglucanas também participam do controle da expansão celular, no crescimento e reserva de carboidratos em sementes (JUNIOR *et al.*, 2006)

Xiloglucanas são fortemente ligadas as microfibrilas de celulose por ligações de hidrogênio e formam uma rede de xiloglucana-celulose. Todas as xiloglucanas, estruturais ou de reserva, tem uma cadeia principal celulósica substituída em O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-xilopiranosose. Algumas unidades de xilopiranosose são substituídos em O-2 por unidades de D-galactopiranosose. Em células primárias, algumas unidades de galactopiranosose são substituídos por fucopiranosose (PIRES, 2008).

Em paredes primárias de dicotiledôneas, a xiloglucana é composta por glucose e xilose, podendo apresentar, em maior ou menor grau, galactose ou galactose e fucose (HAYASHI, 1989, BABA *et al.*, 1994). O xiloglucano de monocotiledôneas geralmente não contém unidades terminais de fucose, possui menos xilose e muito menos galactose que os de dicotiledôneas, embora existam exceções (HAYASHI, 1989).

Degradação e reconstrução de moléculas de xiloglucanas, catalisadas por enzimas tais como endo-1,4- $\beta$ -D-glucanases, xiloglucanases,  $\alpha$ -L-fucosidase e xiloglucana endotransglicosilase são envolvidas na promoção da quebra destes polissacarídeos e regulam a habilidade da perda da rede na parede celular permitindo a expansão celular durante o crescimento (NISHITANI, 1997).

### 2.5.3 Arabinoxilanas

Arabinoxilanas são polissacarídeos neutros constituídos de uma cadeia linear de unidades de D-xilopiranosose em ligação  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) com substituintes de  $\alpha$ -L-arabinofuranosil em O-2 e/ou O-3 (CARVAJAL-MILLAN *et al.*, 2006). Alguns resíduos de arabinose contém ácido ferúlico éster ligado em O-5. Arabinoxilanas de endosperma são extraídas com água e formam uma solução altamente viscosa (CARVAJAL-MILLAN *et al.*, 2006).

Fragmentação de arabinoxilanas é geralmente acompanhada de hidrólise ácida ou enzimática. Unidades de arabinose são geralmente ligadas furanosidicamente, elas são particularmente sensíveis a hidrólise ácida e podem ser seletivamente removidas (BENGTSSON, 1992).

#### 2.5.4 Glucanas

A ocorrência geral de  $\beta$ -glucanas na estrutura de plantas e a dificuldade em sua remoção da parede celular indica que ela atua como componente estrutural (ROUBROEKS *et al.*, 2000).  $\beta$ -glucanas parecem ser polissacarídeos não ramificados compostos de unidades de glucopiranosil (Glc<sub>p</sub>) ligados (1→4) (~70%) e resíduos de Glc<sub>p</sub> ligados (1→3) (~30%) (ROUBROEKS *et al.*, 2000). WOODWARD *et al.* (1993) concluiu que o polissacarídeo tem uma forma sinuosa em solução aquosa. A inserção de ligações (1→3) em intervalos irregulares em  $\beta$ -glucanas de cevada resulta em uma forma irregular e impede extensiva associação intermolecular, isso explica a solubilidade da molécula em água. A presença de longos blocos de ligações (1→4) adjacentes em maior abundância pode explicar a menor solubilidade de  $\beta$ -glucanas (1→3) (1→4) ligadas. A presença destes blocos de permite a ligação a polissacarídeos da parede celular primária por associação não covalente com blocos correspondentes de outras moléculas de  $\beta$ -glucanas, além de poder interagir com regiões não substituídas de cadeias de arabino (1→4)  $\beta$ -xilanas ou com microfibrilas de celulose, formando uma matriz estruturalmente firme enquanto retém a porosidade e a flexibilidade para o desenvolvimento do endosperma. (WOODWARD, 1993). São também polímeros heterogêneos com respeito ao tamanho molecular e estrutura fina, variando de acordo com o tecido, fonte e estágio de maturação (ROUBROEKS *et al.*, 2000).

As  $\beta$ -glucanas podem ser liberadas da parede celular com extração aquosa após extração com Ba(OH)<sub>2</sub> como resultado da remoção de

arabinoxilanas por quebra de ligações éster e ligações de hidrogênio (ROUBROEKS *et al.*, 2000).

### 2.5.5 Galactoglucomananas

Galactoglucomananas (GGMs) são componentes estruturais importantes da parede celular secundária de angiospermas e gimnospermas. Há dois tipos de GGMs, as solúveis em água e as solúveis em álcali, sendo que ambos já foram isolados de angiospermas e gimnospermas. Ambas consistem de resíduos de D-manopiranosil e D-glucopiranosil ligados (1→4), carregando unidades de D-galactopiranosil na posição O-6 de resíduos de D-manose ou D-glucose, embora no caso de *Larix lep- tolepis* os grupos galactosil estão ligados ao O-2 e O-3 das unidades de manosil. As cadeias laterais de GGMs de parede celular primária são compostas de dímeros de -D-Galp-(1→2)-D-Galp-(1→. A parede secundária difere na proporção molar dos resíduos de D-manose e de D-glucose, na quantidade de galactose nas cadeias laterais, além da distribuição e conteúdo de grupos acetil. A proporção de resíduos de D-glucose e D-manose variam entre 1:3 e 1:4 em gimnospermas, e os polissacarídeos da parede celular primária apresenta quantidade aproximadamente igual de ambos. A quantidade de galactose é importante na solubilidade de GGMs, sendo que altas quantidades de D-galactose tornam o molécula mais solúvel em água, enquanto que quantidades menores de 4-5% tornam a molécula menos solúvel ou insolúvel (CAPEK *et al.*, 2000; EBRINGEROVÁ *et al.*, 2008; HANNUKSELAA e PENHOAT. 2004).).

Acetilgalactoglucomananas contém uma cadeia principal de  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-Manp e  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-Glucp com grupos laterais de  $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-Galp e grupos acetil. Há dois tipos de acetilgalactoglucomanana, uma rica em galactose (5-8% p/p), e uma pobre em galactose (10-15% do peso seco). A razão molar de galactose:glucose:manose é de aproximadamente 1:1:3 e 0,1:1:3,

respectivamente. As acetilações são nos grupos hidroxil nas posições C-2 e C-3 (um acetil por 3 ou 4 unidades de hexose) (LUNDQVIST, 2002).

Galactoglucomananas tem sido encontradas em musgos, parede celular secundária de angiospermas e gimnospermas, monocotiledôneas e dicotiledôneas (SILVA; SILVA; PARENTE, 2009) sendo que a razão entre Gal-Glc-Man varia, dependendo da planta, e do estágio de desenvolvimento do tecido.

Um dos vários problemas para se conseguir o isolamento e caracterização de GGMs é sua insolubilidade, provavelmente devido a sua associação com xiloglucanas e/ou fibrilas de celulose.

Galactoglucomananas tem sido extensivamente estudadas inicialmente por sua abundância e importância na indústria de polpa e papel, embora outras aplicações industriais de mananas tenha sido estudadas (HANNUKSELA, 2004).



### 3 JUSTIFICATIVA

O parênquima de *Aloe barbadensis* é utilizado integralmente para diversos fins populares, através de ingestão ou uso tópico, e com ele suas fibras, moléculas de estrutura química desconhecida, de modo que é relevante o conhecimento da estrutura química destas hemiceluloses para que seja possível correlacionar a estrutura destas com sua atividade biológica.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar quimicamente os polissacarídeos presentes no resíduo insolúvel da parede celular do parênquima de *Aloe barbadensis*.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Extrair as hemiceluloses de *Aloe barbadensis*;
2. Purificar as frações polissacarídicas insolúveis através de métodos químicos;
3. Caracterizar estruturalmente as frações principais;
4. Discutir e avaliar os resultados assumindo como parâmetros comparativos os polissacarídeos descritos para outras angiospermas.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL ANALISADO

A coleta das folhas de *Aloe barbadensis* foi realizada na empresa Naturama Sucos integrais do Brasil, em Paulo Lopes, SC.

Foram utilizados 11,6 kg de folhas de *A. barbadensis in natura*. As folhas foram lavadas e descascadas, obtendo-se 8,15 Kg de parênquima (peso úmido, ou cerca de 16,5 g de peso seco). O parênquima foi centrifugado em Centrífuga HITACHI CENTRIFUGE CR21E rotor 46, por 20 min, à 10°C, a 8000 RPM obtendo-se um resíduo e um extrato.

### 5.2 Extração do polissacarídeo

O resíduo obtido através da centrifugação (item 5.1) foi lavado em água corrente, congelado, liofilizado e triturado em liquidificador, alcançando rendimento final de 10 g (60% de rendimento em relação ao peso seco).

Com o objetivo de isolar e caracterizar fibras, foram realizadas 22 extrações seqüenciais, nas quais o material foi submetido às seguintes condições (Figura 5):

- 4 extrações aquosas à temperatura ambiente por 24 h;
- 2 extrações aquosas a 80°C por 5 h;

Todas as amostras foram filtradas em filtro de papel, concentradas e liofilizadas, sendo que as amostras extraídas à temperatura ambiente foram agrupadas e identificadas como “F” e as amostras das extrações a quente foram identificadas como “Q1” e “Q2”.

A seguir, o resíduo foi submetido a extrações alcalinas, com aumento sucessivo da molaridade (Figura 5).

- 7 extrações alcalinas com solução aquosa de NaOH a 0,5 M, a temperatura ambiente, por 5 h, com NaBH<sub>4</sub>;
- 5 extrações alcalinas com solução aquosa de NaOH 2 M por 5 h a temperatura ambiente com NaBH<sub>4</sub>;
- 1 extração alcalina com NaOH a 0,5 M por 2 h a 80°C com NaBH<sub>4</sub>;
- 1 extração alcalina de NaOH 2 M com NaBH<sub>4</sub> por 2 h a 80°C;
- 2 extrações com NaOH a 4 M com NaBH<sub>4</sub> por 2 h a temperatura ambiente.

Todos os produtos das extrações alcalinas foram centrifugados e, em seguida, filtrados em filtro de papel Qualy poro 14 previamente lavado com solução de NaOH, sob pressão reduzida com bomba á vácuo, sendo que o filtrado foi então neutralizado com HCl, concentrado em rotaevaporador, dialisado em membrana de 6-8 KDa, concentrado e liofilizado. As amostras foram identificadas com a letra “A” e o número da extração, de “A1” à “A16”.

As frações resultantes foram analisadas quanto a seu perfil de eluição, composição monossacarídica e RMN, e após análise dos resultados, as amostras A3-A5 obtidas com NaOH 0,5 M a 25°C foram agrupadas e nomeadas como X-1, e as frações obtidas com NaOH 2 M a 25°C foram agrupadas, formando a fração X-2.

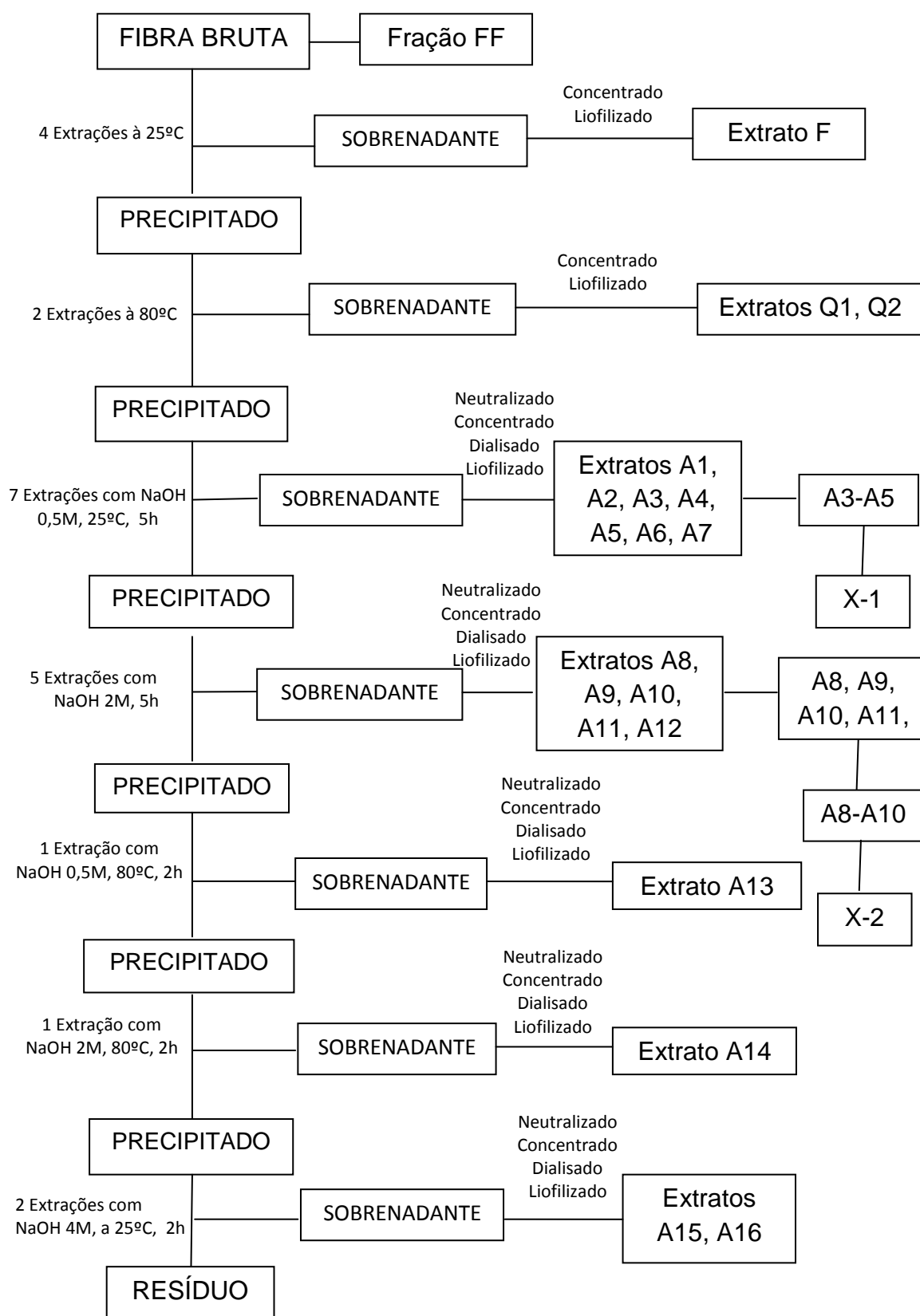


FIGURA 5: FLUXOGRAMA DE EXTRAÇÃO DE HEMICELULOSES DE *Aloe barbadensis*

### 5.3 FRACIONAMENTO POR SOLUBILIDADE

As frações X-1 e X-2 foram fracionados por solubilidade da seguinte forma: X-1 e X-2 foram ressuspensos em H<sub>2</sub>O destilada (12 mg/mL) e mantidos sob agitação magnética por 15 h, centrifugado em microcentrífuga MODELO MDC-2000 por 10 min a 10.000rpm. O sobrenadante e o precipitado foram liofilizados. O precipitado foi submetido ao mesmo tratamento por mais duas vezes, mantendo a relação de 12 mg/mL. Os sobrenadantes de cada etapa foram agrupados originando a X-1-S e X-2-S, enquanto que os precipitados finais foram liofilizados, originando as frações X-1-P e X-2-P (FIGURA 6).

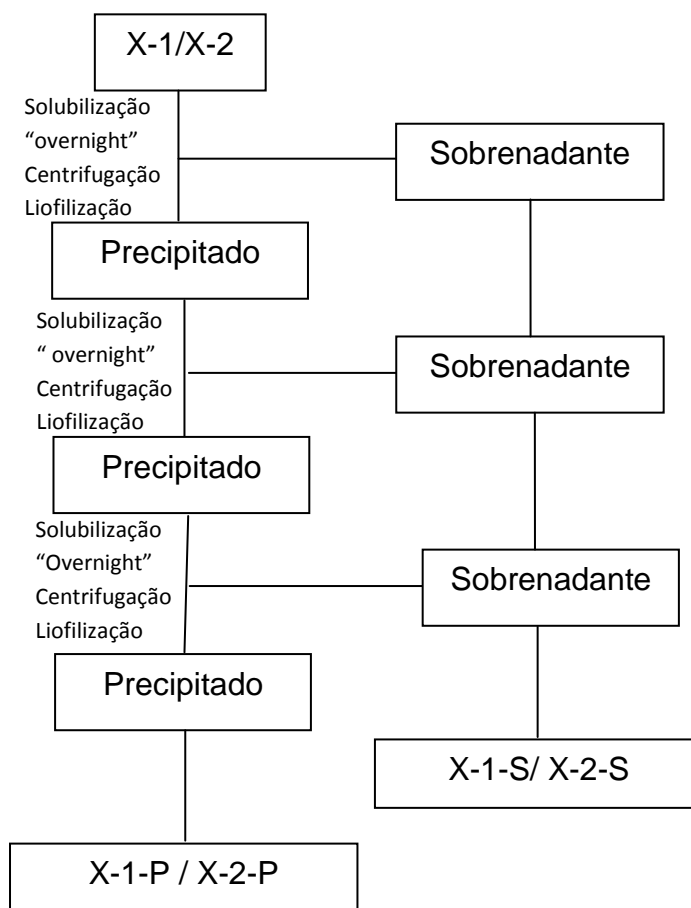


FIGURA 6: FRACIONAMENTO DO MATERIAL SOLÚVEL E INSOLÚVEL DAS FRAÇÕES X-1 E X-2

## 5.4 PRECIPITAÇÃO DE FEHLING

Para precipitação de Fehling são utilizadas duas soluções (A e B). A solução A é composta por tartarato de potássio e sódio e KOH (173 g + 125 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml, respectivamente), enquanto que a B consiste de sulfato de cobre 5.H<sub>2</sub>O (55,7 g / H<sub>2</sub>O q.s.p. 500 ml) (JONES; STOODLEY, 1965).

As frações X-1-S (65 mg) e X-2-S (157 mg) foram dissolvidas na solução de Fehling A até completa solubilização sob agitação magnética a TA. Após completa solubilização da amostra foi adicionado igual volume da solução de Fehling B. Após vigorosa agitação em vórtex, a amostra foi mantida sob refrigeração por 12 h e então centrifugada (10000 rpm, 10 min, TA). As frações obtidas (precipitado e sobrenadante) foram neutralizadas com ácido acético (HOAc), dialisadas contra água corrente (~ 48 horas), deionizadas por resina catiônica Dowex, filtradas e liofilizadas, originando as frações X-1-PF, X-2-PF, X-1-SF e X-2-SF (Figura 7).

## 5.5 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS

### 5.5.1 Dosagem de proteína total

A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método de LOWRY *et al.* (1951) (HARTREE, 1972), utilizando-se o reativo de Folin-Ciocalteu, com sensibilidade de 5-100 µg de proteína. O padrão utilizado foi uma solução 1 mg/mL de BSA (albumina de soro bovino). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 660 nm.

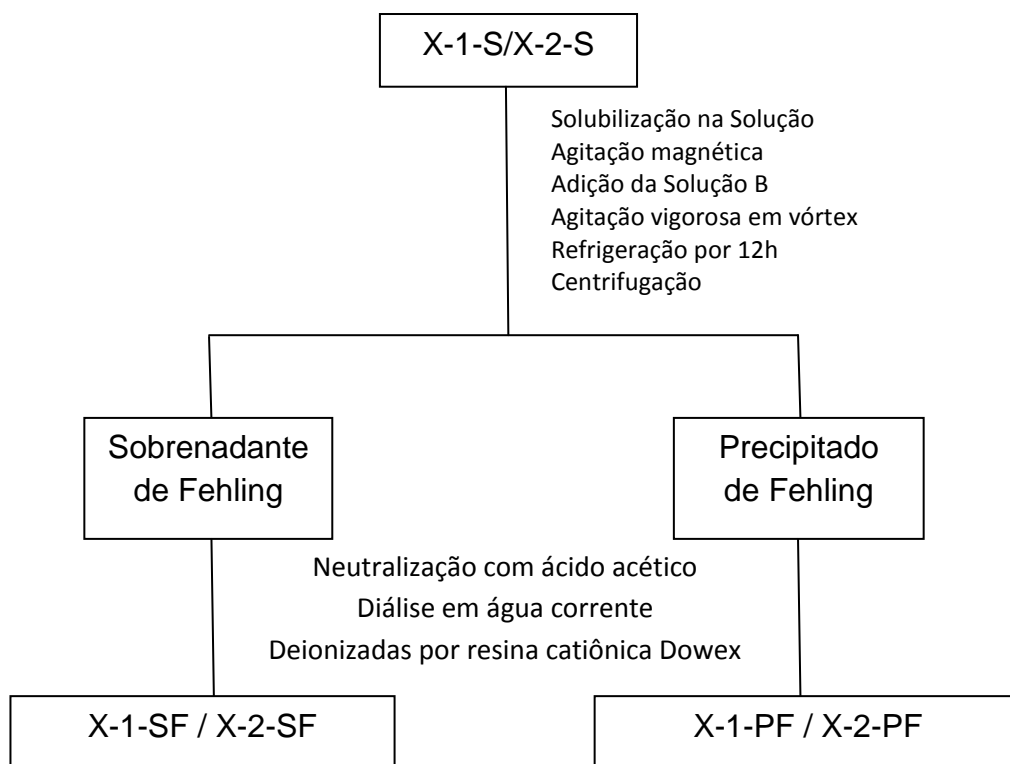


FIGURA 7: ESTRATÉGIA DE PURIFICAÇÃO ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE FEHLING

### 5.5.2 Dosagem de carboidratos totais

As dosagens de carboidratos totais foram realizadas através do método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), com sensibilidade de 10-50 µg de açúcar, utilizando-se como padrão a xilose (solução de 100 µg/mL). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 490 nm.

### 5.3.3 Dosagem de ácido urônico

Para a determinação de ácidos urônicos dos polissacarídeos foi utilizado o método do *m*-hidroxibifenil descrito por FILIZETTI-COZZI e CARPITA (1991).



Foi utilizado ácido glucurônico como padrão e a leitura feita em espectrofotômetro em 520 nm.

#### 5.5.4 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Os extratos Q1 e Q2 foram submetidos à hidrólise em TFA 2 M a 120°C . por 2 h. O ácido foi evaporado e a amostra ressuspensa em água e foi aplicada em placa de cromatografia de camada delgada. A fase móvel utilizada foi composta de acetato de etila, propanol, ácido acético e água na relação 2:1:1:0,5. Após a ativação da placa de cromatografia em estufa a 100°C por 30 min, foram aplicadas as amostras e os padrões de ácidos urônicos (ácido glucurônico e ácido galacturônico) com capilares. Após aplicação, a placa foi mergulhada na fase móvel e foi realizada a corrida. Em seguida a placa foi seca em estufa e revelada com Orcinol.

#### 5.5.5 Composição monossacarídica

##### 5.5.5.1 Hidrólise ácida total

Para análise da composição monossacarídica, frações das amostras (1-2 mg) foram hidrolisadas com 1 mL TFA 2 M por 2 h a 120°C. Após hidrólise, o ácido foi removido por evaporação.

#### 5.5.5.2 Redução e acetilação dos produtos de hidrólise

Os produtos de hidrólise (monossacarídeos livres) foram ressuspensos em H<sub>2</sub>O, reduzidos com NaBH<sub>4</sub> por 12 h, a TA. Após redução, o excesso de NaBH<sub>4</sub> foi destruído abaixando o pH até 5 com ácido acético 50% e eliminando o ácido bórico formado por co-destilações sucessivas com metanol (5x).

Os alditóis produzidos foram em seguida acetilados com a adição de 1 mL de anidrido acético na amostra previamente liofilizada a 120°C por 1 h. O processo foi interrompido com a adição de água. Os alditóis acetatos obtidos foram extraídos com clorofórmio, e à fase clorofórmica lavada com uma solução de bicarbonato de sódio saturada (5x), e água (8x).

O clorofórmio contendo os derivados alditóis, foi evaporado, e as amostras submetidas à análise em cromatografia líquida gasosa (GLC).

#### 5.5.6 Cromatografia líquido gasosa (GLC)

As análises por cromatografia para avaliar a composição monossacarídica foram realizadas em Cromatógrafo a gás VARIAN, utilizando nitrogênio como gás de arraste e coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.), revestida internamente com DB-225 (0,25 µm). As análises cromatográficas para acetatos de alditóis foram realizadas à 220 °C, com o injetor a 250 °C e detector de ionização de chama a 300 °C.

### 5.5.7 Cromatografia de Gel Permeação (HPSEC-MALLS)

Para análise de homogeneidade foram preparadas soluções dos polissacarídeos na concentração de 1 mg/mL em solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$  0,1 M) contendo azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ , 200 ppm). As soluções obtidas foram filtradas em membranas MILLIPORE (acetato de celulose) de 0,22  $\mu\text{m}$ . As análises foram realizadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) WATERS, equipado com um detector de índice de refração diferencial (RID) WATERS modelo 2410 e com detector de índice de espalhamento de luz em mutiângulos (MALLS) WAYTT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP, com 18 detectores dispostos ao redor da fotocélula em diferentes ângulos. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS, com limites de exclusão de  $7 \times 10^6$ ,  $4 \times 10^5$ ,  $8 \times 10^4$  e  $5 \times 10^3$  (Colunas Ultrahydrogelt 2000, 500, 250 e 120, respectivamente) em série. O eluente utilizado foi uma solução de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ , 0,1 M) contendo azida de sódio (200 ppm), pressão de 920 psi a 20°C.

### 5.5.8 Análise por RMN – $^{13}\text{C}$

Os espectros de (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) foram obtidos em espectrômetro Brucker, modelo Avance-DRX-400, em tubos de 5 mm de diâmetro. Os deslocamentos químicos, expressos em ppm, foram calibrados com acetona como padrão interno para análises de  $^{13}\text{C}$  ( $\delta$  32.00).

Para as análises de RMN  $^{13}\text{C}$ , as amostras passaram por diferentes processos de solubilização devido à diferença de sua composição.

As amostras A1, A5, A8 e A9 foram solubilizadas em 700  $\mu\text{L}$  NaOH 0,5 M em  $\text{D}_2\text{O}$ , pois se apresentaram insolúveis em água deuterada. Tal fato acontece pois a amostra foi extraída com álcali.

Após análise, as amostras foram recuperadas por neutralização e diálise em membrana 6-8 KDa contra água corrente, água destilada e água MiliQ.

A fração X-2-P foi solubilizada em água deuterada com NaOH 0,5 M.

As frações solúveis (X-1S, X-2S) e os precipitados de Fehling (X-1-PF, X-2-PF) foram solubilizados em água deuterada.

#### 5.5.9 Análises de metilação

A metilação dos polissacarídeos foi realizada segundo CIUCANU e KEREK (1984) onde 5 a 10 mg da amostra foram solubilizadas em Me<sub>2</sub>SO (2 mL). Após completa dissolução, foi adicionado NaOH pulverizado (30 mg) e a mistura foi mantida sob agitação por 30 min, e em seguida, adicionou-se 0,2 mL de iodeto de metila (CH<sub>3</sub>I), e a mistura foi mantida em agitação por mais 30 min. O processo foi repetido 3 vezes. A reação foi interrompida pela adição de água e a solução neutralizada com ácido acético 50%, dialisada e liofilizada, estando pronta então para a derivatização.

##### 5.5.9.1 Derivatização dos polissacarídeos metilados

O material foi hidrolisado com ácido fórmico 50% a 100°C por 16 h. Foram eliminados os ácidos dos produtos de hidrólise, reduzidos com NaBD<sub>4</sub> e então submetidos a co-destilação com metanol 3 vezes.

Os derivados alditóis metilados foram em seguida acetilados com a adição de 1 mL de anidrido acético na amostra seca a 120°C por 1 h. O

processo foi interrompido com a adição de água. Os acetatos de alditóis metilados obtidos foram extraídos com clorofórmio, e a fase clorofórmica foi lavada com uma solução de bicarbonato de sódio saturada (5x), e posteriormente com água ( 8x).

O clorofórmio contendo os derivados alditóis, foi evaporado ficando desta forma os acetatos de alditóis parcialmente metilados prontos para análise por GLC acoplada a espectrometria de massas (CLG-EM)

A análise foi realizada em CROMATÓGRAFO Varian 3.800 e MS 4000 Condições de análise: forno inicial a 50°C, foi à 160°C com taxa de crescimento de 20°C/min até 160°C durante 8,5 min, na sequência aumento a 20°C/min até 200°C por 28,5 min e uma última rampa a 10°C até 250°C, totalizando 40 min.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 EXTRAÇÃO SEQUENCIAL DE POLISSACARÍDEOS DE *A. barbadensis*

As folhas de *A. barbadensis* foram descascadas e a parte interna das mesmas, o parênquima, popularmente denominado “gel de babosa”, foi centrifugado. O material precipitado, de aspecto fibroso foi liofilizado rendendo a fração estudada no presente trabalho. Esta fração foi denominada FF (fração fibrosa) e apresentou um rendimento de 60% em relação ao peso seco das folhas.

A fração FF foi submetida a uma extração seqüencial. A tabela a seguir demonstra o rendimento das frações obtidas em relação ao material inicial de extração (3 g):

TABELA 2: RENDIMENTO DAS EXTRAÇÕES SEQUENCIAIS DA FRAÇÃO FIBROSA DE *A. barbadensis*

EXTRATO	TIPO DE EXTRAÇÃO	RENDIMENTO (mg)	RENDIMENTO (%)
F	Aquosa, TA	87,8	2,8
Q1	Aquosa, 80°C	78,5	2,5
Q2	Aquosa, 80°C	51,7	1,7
A1	NaOH 0,5M TA	73,4	2,4
A2	NaOH 0,5 M TA	42,4	1,4
A3	NaOH 0,5 M TA	50,6	1,6
A4	NaOH 0,5 M TA	19,6	0,6
A5	NaOH 0,5 M TA	148,8	4,8
A6	NaOH 0,5 M TA	40,3	1,3
A7	NaOH 0,5 M TA	13,4	0,4

A8	NaOH 2 M TA	143,0	4,6
A9	NaOH 2 M TA	107,5	3,5
A10	NaOH 2 M TA	88,4	2,8
A11	NaOH 2 M TA	96,1	3,1
A12	NaOH 2 M TA	51,7	1,7
A13	NaOH 0,5 M a 80°C	132,9	4,3
A14	NaOH 2 M a 80°C	76,5	2,5
A15	NaOH 4 M TA	141,1	4,5
A16	NaOH 4 M TA	42,6	1,4

De acordo com a tabela 2, as frações que se destacam por seu maior rendimento são as frações A5, A8, A13 e A15, sendo que as frações de maior rendimento foram obtidas através de extrações alcalinas. O rendimento total da extração foi de 47,9%.

A tabela 3 mostra a porcentagem de proteína, carboidratos totais e ácidos urônicos em cada um dos extratos obtidos a partir da fração fibrosa de *A. barbadensis*.

TABELA 3: PORCENTAGEM DE PROTEÍNA, CARBOIDRATOS TOTAIS E ÁCIDOS URÔNICOS NOS EXTRATOS OBTIDOS A PARTIR DE FF DE *A. barbadensis*

EXTRATO	PROTEÍNA <sup>a</sup> (%)	% AÇÚCAR TOTAL <sup>b</sup> (padrão Xylose)	ÁCIDO URÔNICO <sup>c</sup> (%)
F	16,48	30,8	3,6
Q1	6,10	28,2	34,2
Q2	6,81	27,1	7,6
A1	11,43	24,5	16,4
A2	19,43	37,1	24,2

A3	7,90	46,6	11,1
A4	5,71	nd	2,5
A5	0,38	64,8	1,9
A6	4,38	62,7	2,2
A7	10,54	nd	2,0
A8	6,25	87,7	4,1
A9	8,24	81,4	3,5
A10	7,10	69,4	17,0
A11	5,46	75,0	3,3
A12	4,38	30,2	31,5
A13	4,86	80,1	34,2
114	3,95	30,0	nd
A15	3,30	40,4	25,1

(a): determinado segundo LOWRY *et al.* (1951); (b): determinado pelo método fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956); (c) : determinado segundo FILISETTI-COZZI e CARPITA (1991);

A maior parte das amostras apresentou baixos teores de proteína e altos valores de ácidos urônicos nas amostras extraídas à quente e nas 2 primeiras extrações alcalinas. Isso poderia indicar a presença de pectinas nos extratos mencionados anteriormente.

Algumas amostras apresentaram na dosagem valores maiores do que 100%, e por isto constam na tabela como “não determinado”. Os valores de açúcar total variaram entre 24,5 e 87,7% e os valores de ácidos urônicos variaram entre 1,9 e 34,2%. A fração A 16 não foi analisada.



## 6.2 COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA

As amostras foram analisadas após hidrólise total na forma de acetatos de alditóis por cromatografia líquida gasosa. Os resultados se encontram na tabela a seguir:

TABELA 4: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DOS EXTRATOS OBTIDOS

Extrato	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol % <sup>b</sup> )							
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
F	2,7	2,6	1,1	5,8	17	51	11,7	8,1
Q1	17,2	2,7	Tr <sup>c</sup>	11	13	33,1	9,6	12,4
Q2	20	2,5	1,1	14,3	13	29,1	9,7	10,3
A1	9,5	10	-	18,2	38,9	15	5,7	2,7
A2	5,6	-	-	12,2	56,5	3,3	5,7	16,7
A3	2,2	5	-	8	59,5	2,6	4,4	18,3
A4	1	2,9	Tr	5,4	57,4	3,2	5,7	24,3
A5	Tr	4,2	-	-	51,6	6,9	6,7	30,1
A6	Tr	2,7	1,1	1,7	29,5	26	5,6	32,6
A7	-	1,8	6,1	5,1	59	10,1	3,5	14,4
A8	Tr	Tr	-	3,5	69,9	15,6	2	7,9
A9	-	-	-	4	80,9	10,8	0,9	3,4
A10	Tr	Tr	Tr	3,3	76,5	12,3	1,5	5
A11	Tr	Tr	-	-	83	10,9	1,3	3,9
A13	Tr	-	4	-	80,2	11,5	3,9	-
A14	Tr	Tr	-	3,8	29	37,7	2,7	26,4
A15	4,6	-	1,3	Tr	58,5	18,8	1,3	14,7
16		Tr	-	3,8	29	37,7	2,7	26,4

<sup>a</sup>: Analisado por GLC após hidrólise total (TFA 2M, 120°C, 2h), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação

<sup>b</sup>: Percentual relativo às áreas de todos os picos

Tr: Traços ( $\leq 1\%$ )

Nos extratos aquosos, é predominante a presença de manose, o que já era esperado, pois o polissacarídeo solúvel mais abundante em *Aloe*

*barbadensis* é a manana/acemanana, conforme relata a literatura (BOZZI, 2007; FEMENIA *et al.*, 2003; VEGA, 2005).

Nos extratos alcalinos, a presença de xilose é predominante, além de glucose e arabinose, o que pode indicar a presença de xilanas, arabinoxilanas e xiloglucanas, o que estaria de acordo com a revisão bibliográfica, que cita estes polissacarídeos como componentes da parede celular de angiospermas (NORTHCOTE, 1972).

### 6.3 ANÁLISE POR HPSEC-MALLS-RID DOS EXTRATOS

Os extratos aquosos e alcalinos de FF foram analisados por cromatografia líquida de exclusão estérica (HPSEC) com multidetecção. Foram utilizados os detectores do espalhamento de luz (MALLS) e índice de refração diferencial (RID). O primeiro detecta a presença de moléculas de elevada massa molar enquanto o segundo detecta tanto moléculas orgânicas quanto inorgânicas de elevada ou baixa massa molar. O volume total do sistema cromatográfico foi de aproximadamente 42 mL e o tempo de eluição foi de aproximadamente de 80 minutos. A seguir é apresentado o perfil de eluição dos extratos da fração fibrosa de *A. barbadensis*.

Na fração F, extraída com água à TA, percebe-se um perfil de eluição bastante heterogêneo, com moléculas de diferentes pesos moleculares eluindo entre 40 e 70 min. Devido à baixa massa molar, as moléculas não foram detectadas pelo espalhamento de luz (Figura 8).

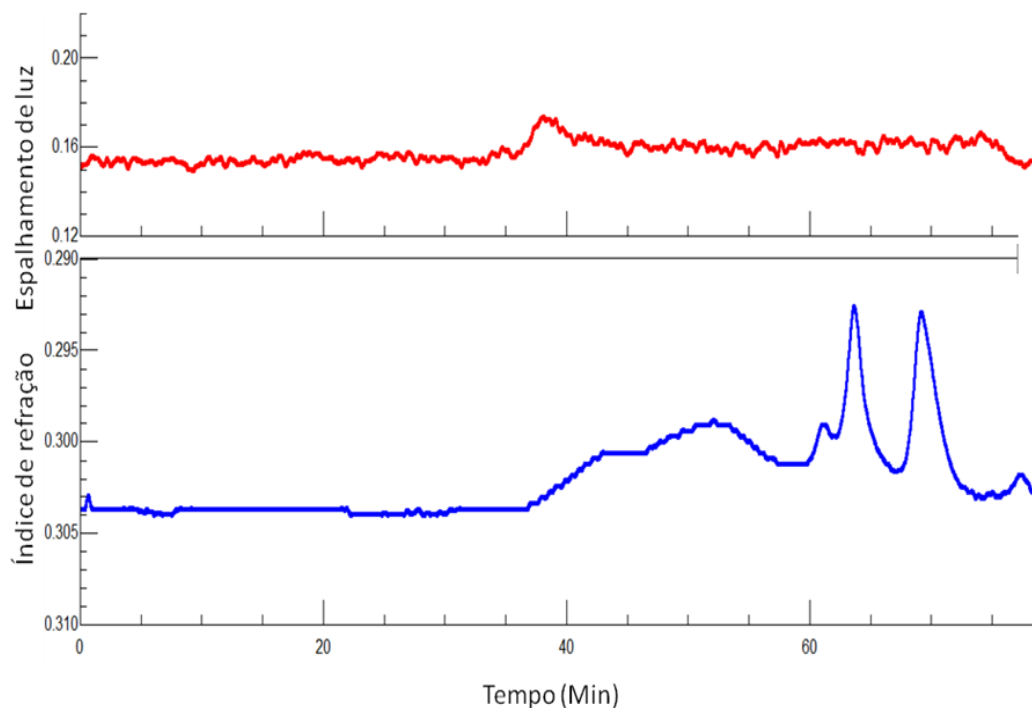


FIGURA 8: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DA FRAÇÃO EXTRAÍDAS A FRIO DE *Aloe barbadensis* (F)

Os extratos Q1 e Q2 mostraram perfis de eluição heterogêneos semelhantes (Figura 9), o que já era esperado ao se analisar a composição monossacarídica (Tabela 4), onde 6 monossacarídeos estão presente em quantidade considerável. Observa-se em ambas as amostras a presença de uma molécula com peso molecular maior no tempo de eluição entre 35-40 min, e esta foi detectada pelo espalhamento de luz. As moléculas eluídas em seguida apresentam peso molecular menor.

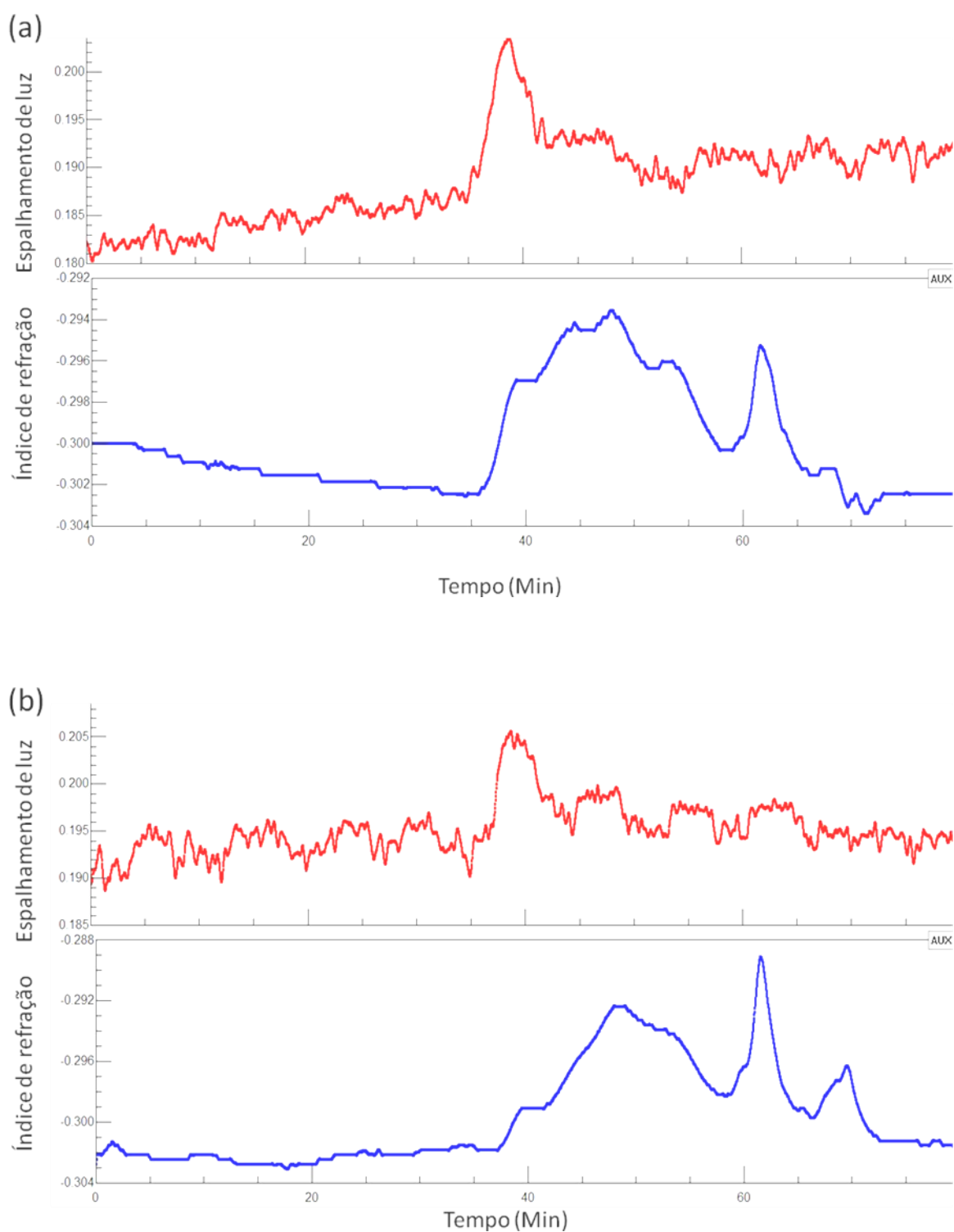
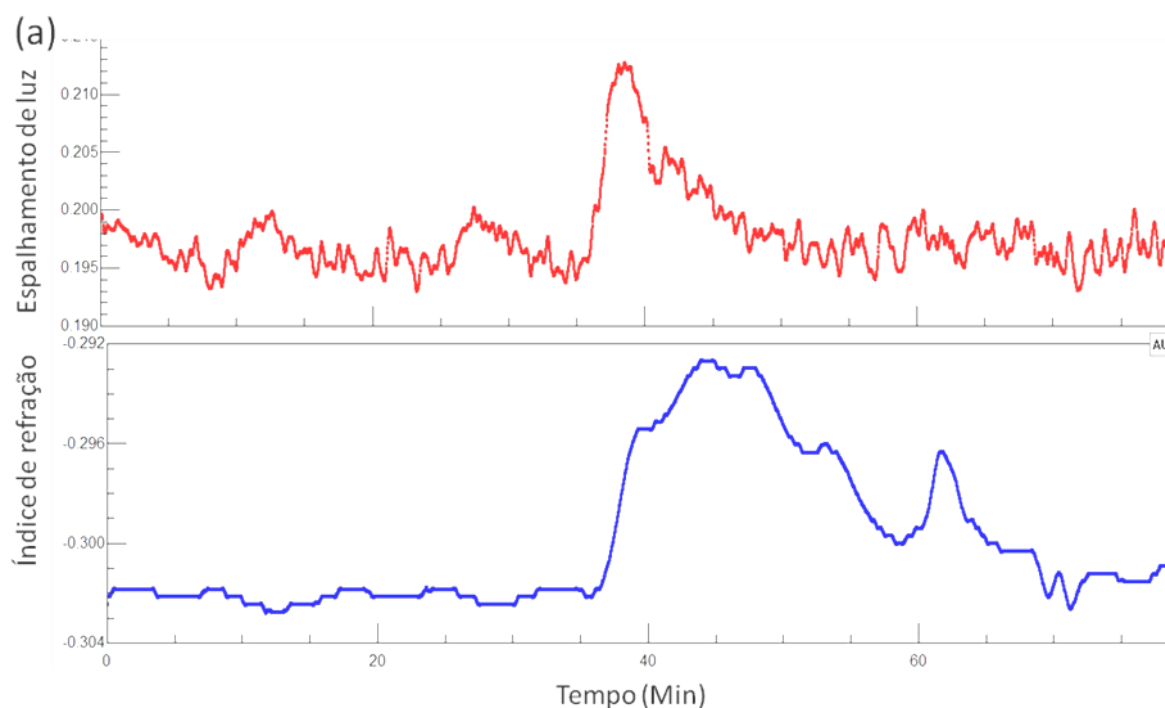
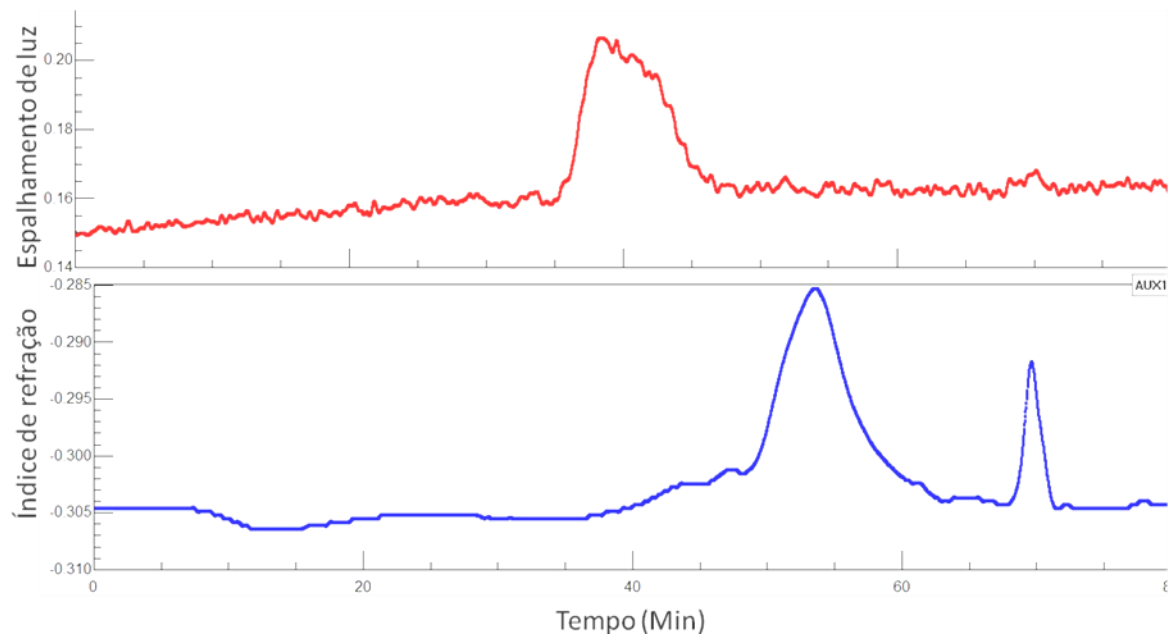


FIGURA 9: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS A QUENTE DE *Aloe barbadensis* (a) Q1 (b) Q2

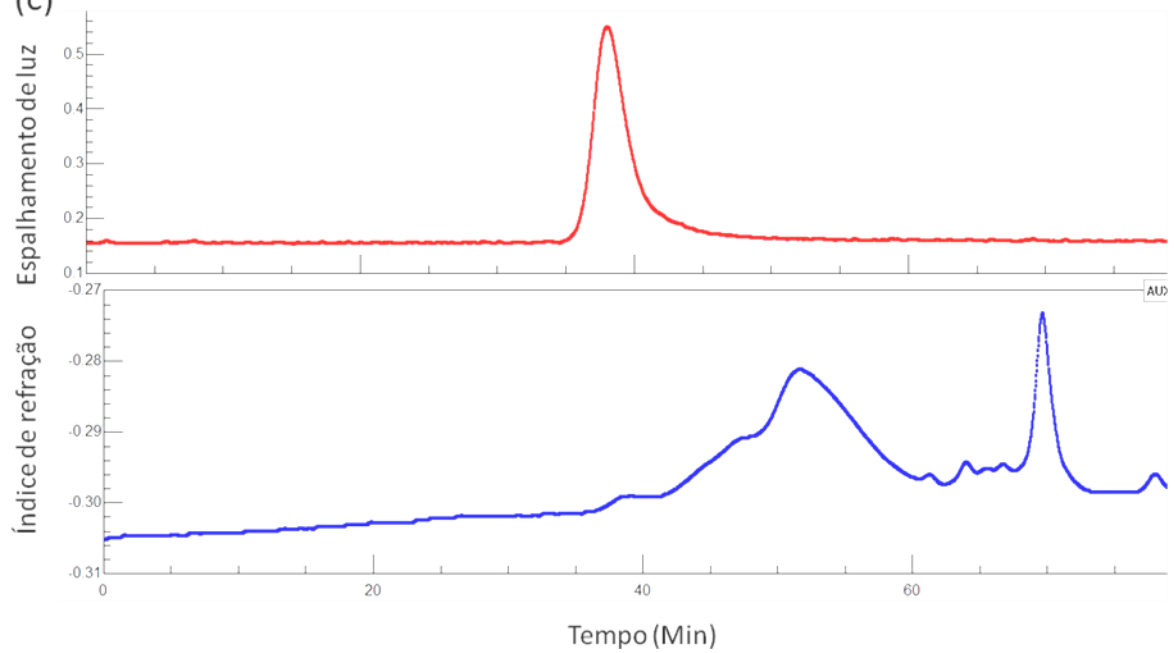
Entre os extratos A1-A7, observa-se um perfil de eluição heterogêneo, e o perfil de eluição de A1 ainda é bem semelhante ao perfil de eluição dos extratos aquosos, o que pode ser explicado pela presença de moléculas solúveis em água ainda presentes neste extrato. As frações A1-A5 também apresentam uma molécula de alto peso molecular eluída entre 35-40 min que é detectada pelo espalhamento de luz, no entanto o índice de refração detecta moléculas até 60 min, demonstrando que há uma mistura de moléculas de alto e baixo peso molecular. A partir de A6, as amostras começam a eluir a partir de 40 min, o que demonstra que estas frações apresentam moléculas menores. Tal fato acontece, pois hemiceluloses, material extraído com álcali, possuem peso molecular menor. O mesmo pode ser observado para os outros extratos extraídos com NaOH (XU, *et al*, 2006).



(b)



(c)



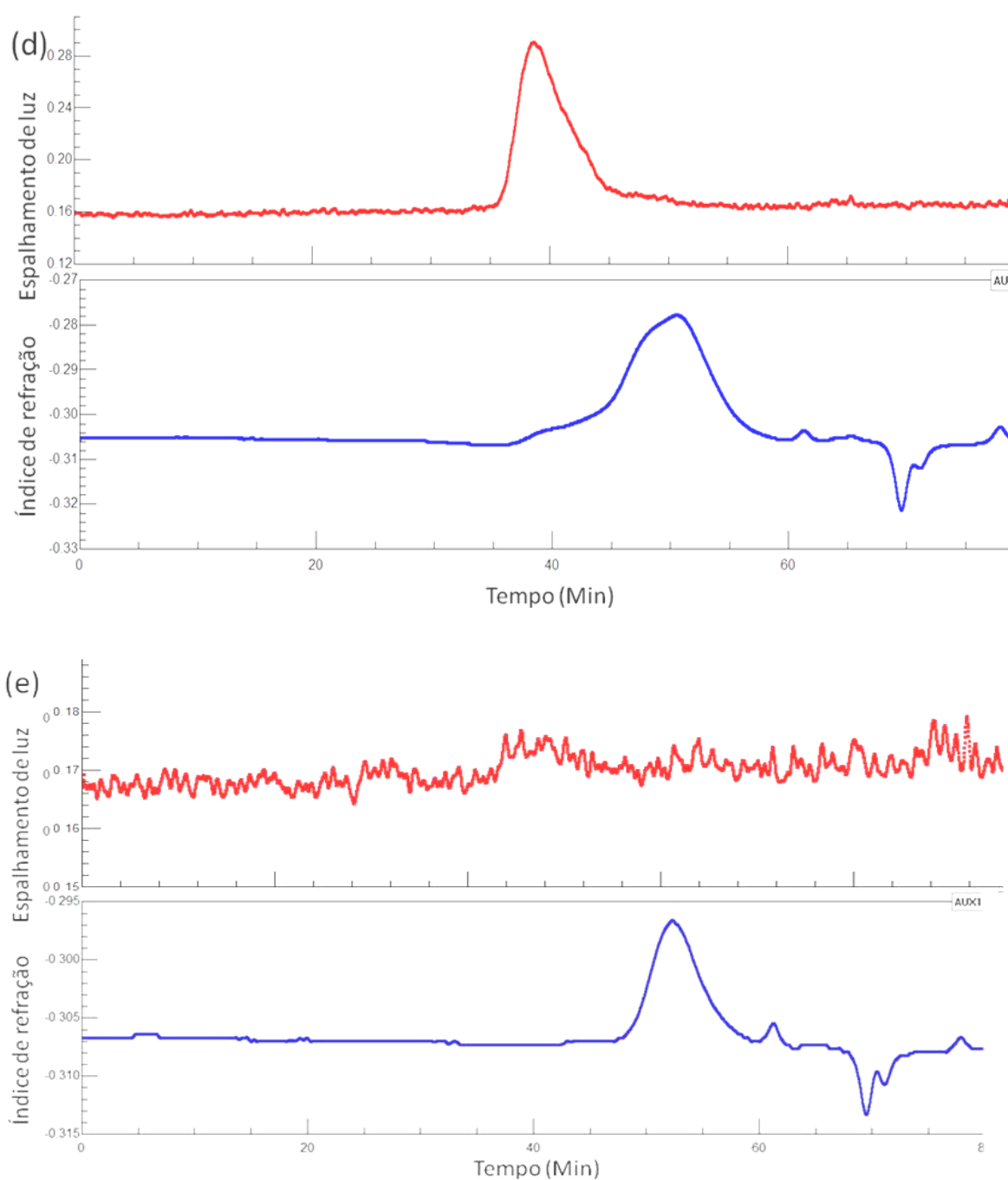
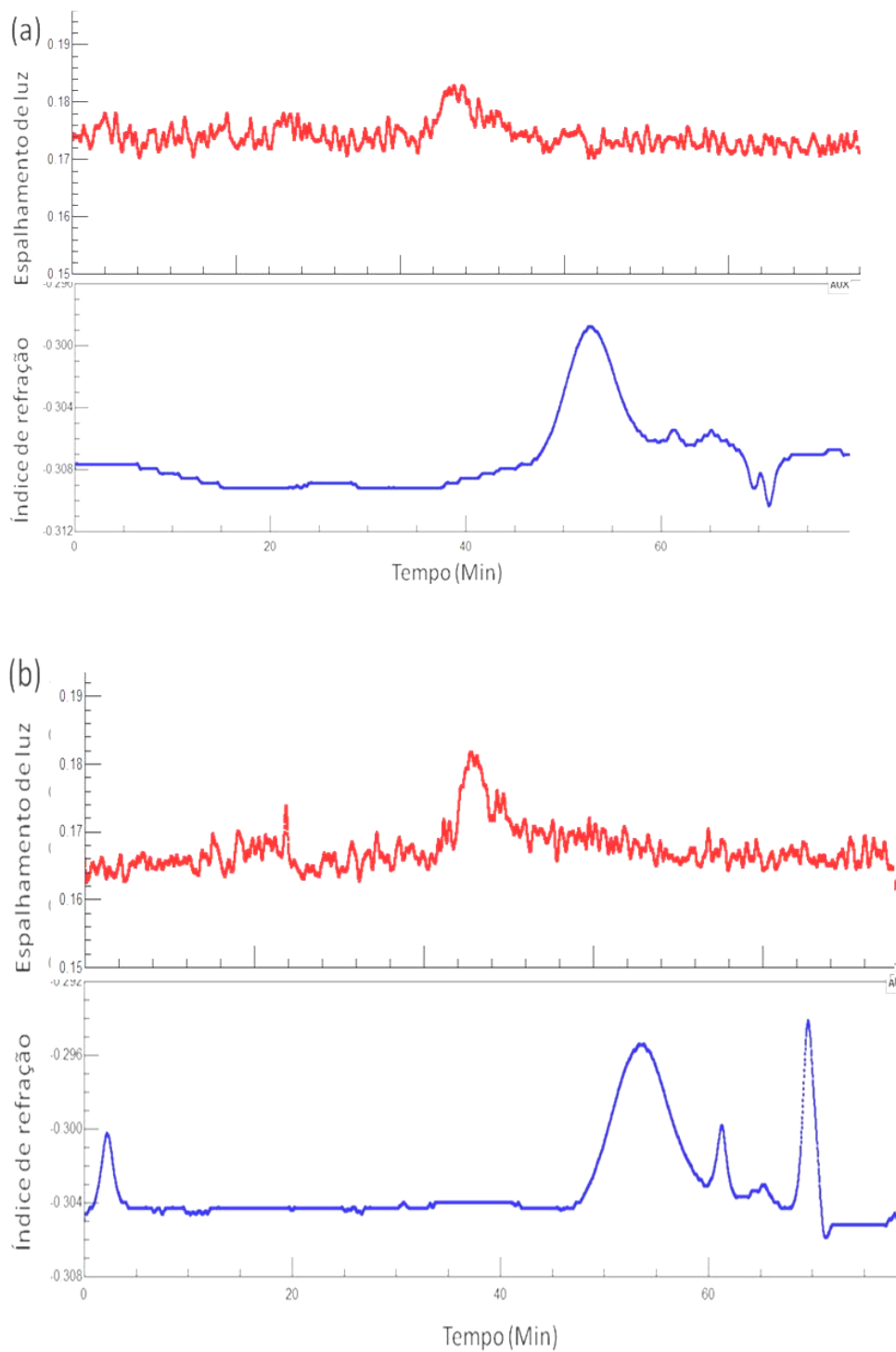


FIGURA 10: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS COM NaOH 0,5 M DE *Aloe barbadensis* (a) A1 (b) A2 (c) A3 (d) A5 (e) A6

Na análise geral dos perfis dos extratos (Figuras 10, 11 e 12) percebe-se que até a 3<sup>a</sup> extração alcalina, as amostras apresentam-se bastante

heterogêneas, no entanto este perfil apresenta-se com menos picos a partir da 5<sup>o</sup> extração, destacando-se os extratos A5, A6, A8, A9, A10, A11, A12, A13 e A15.





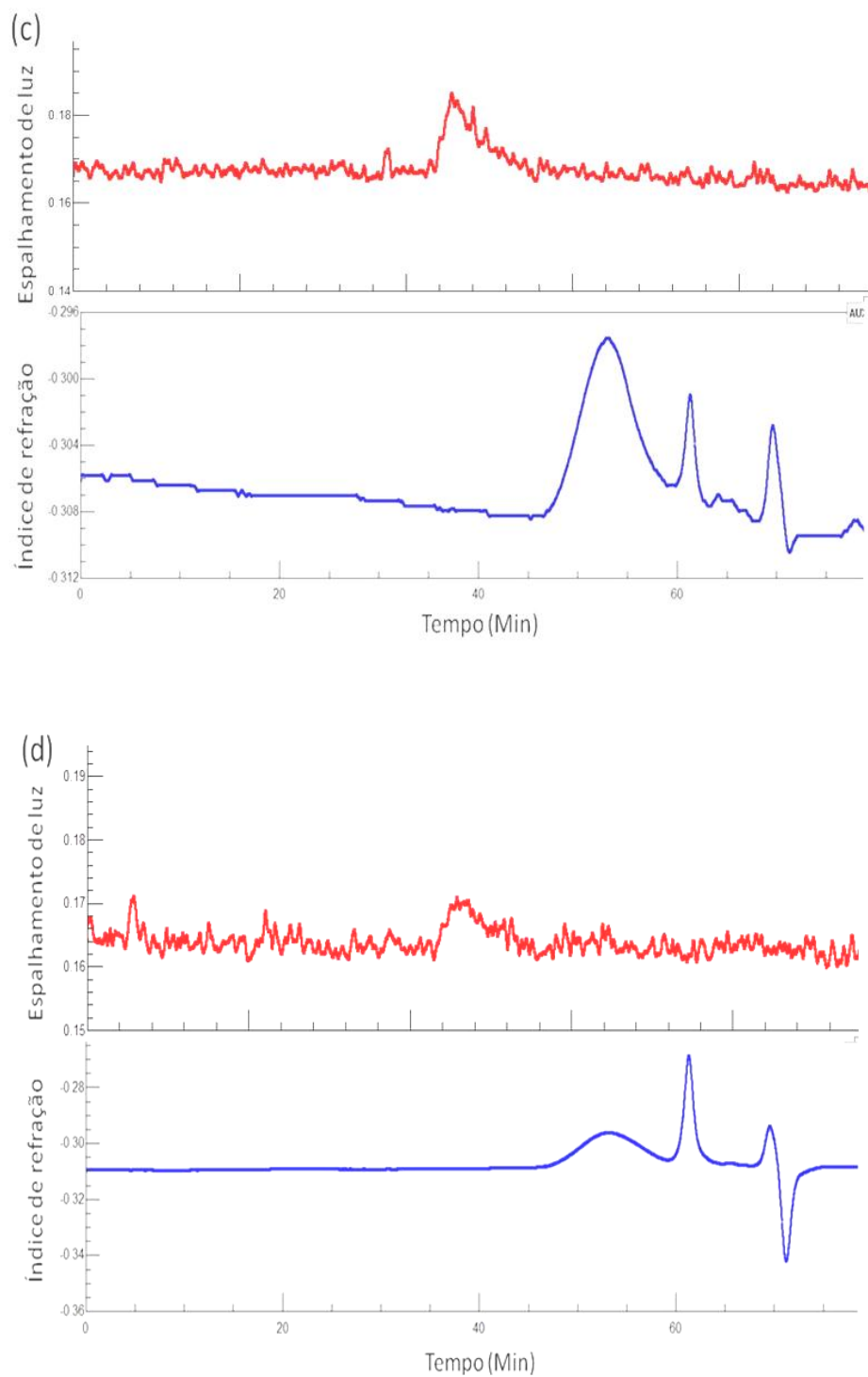
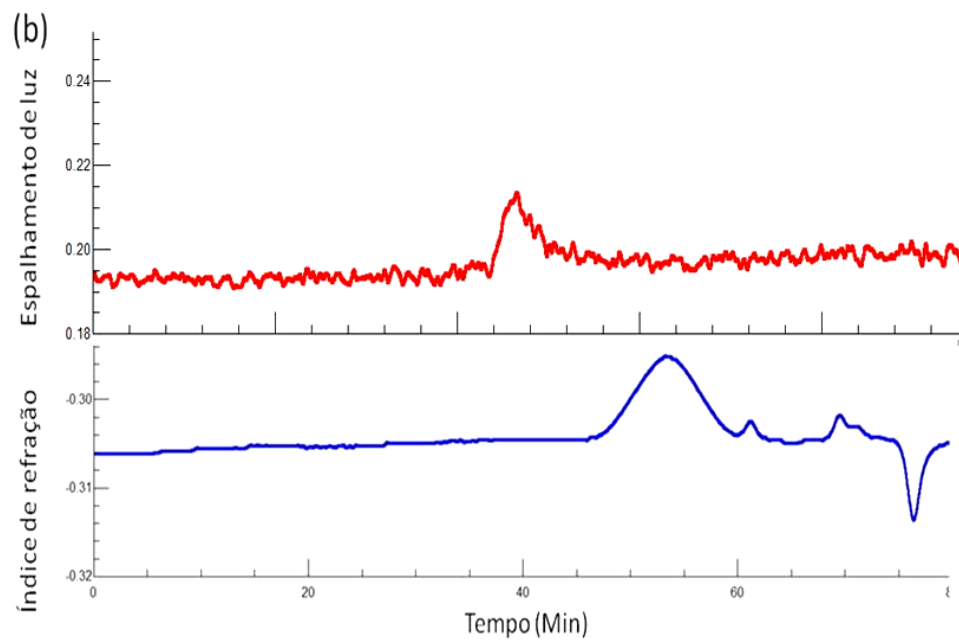
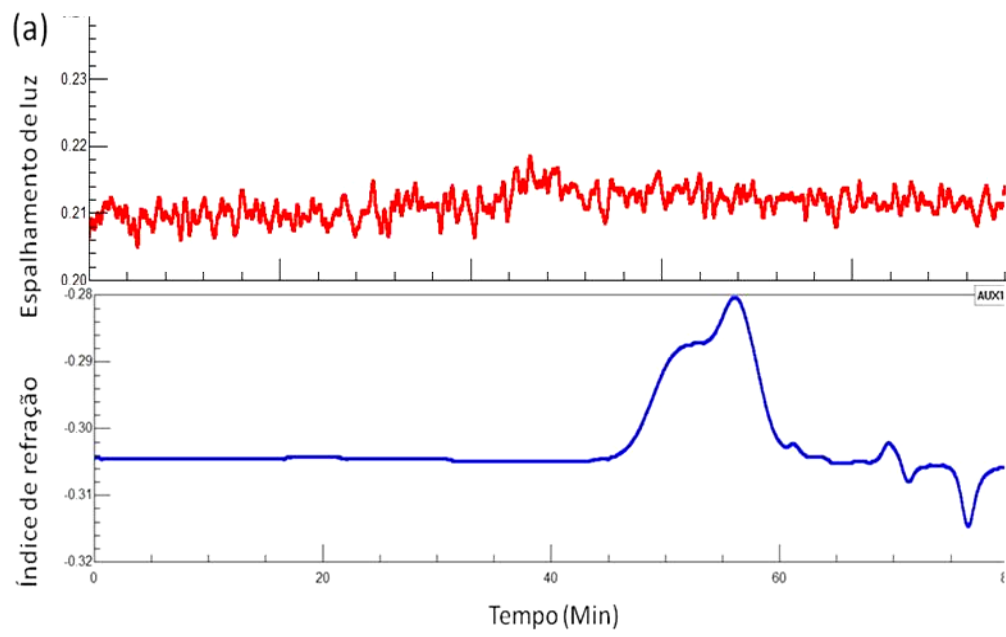


FIGURA 11: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS COM NaOH 2M DE *Aloe barbadensis* (a) A8 (b) A9 (c) A10 (d) A11



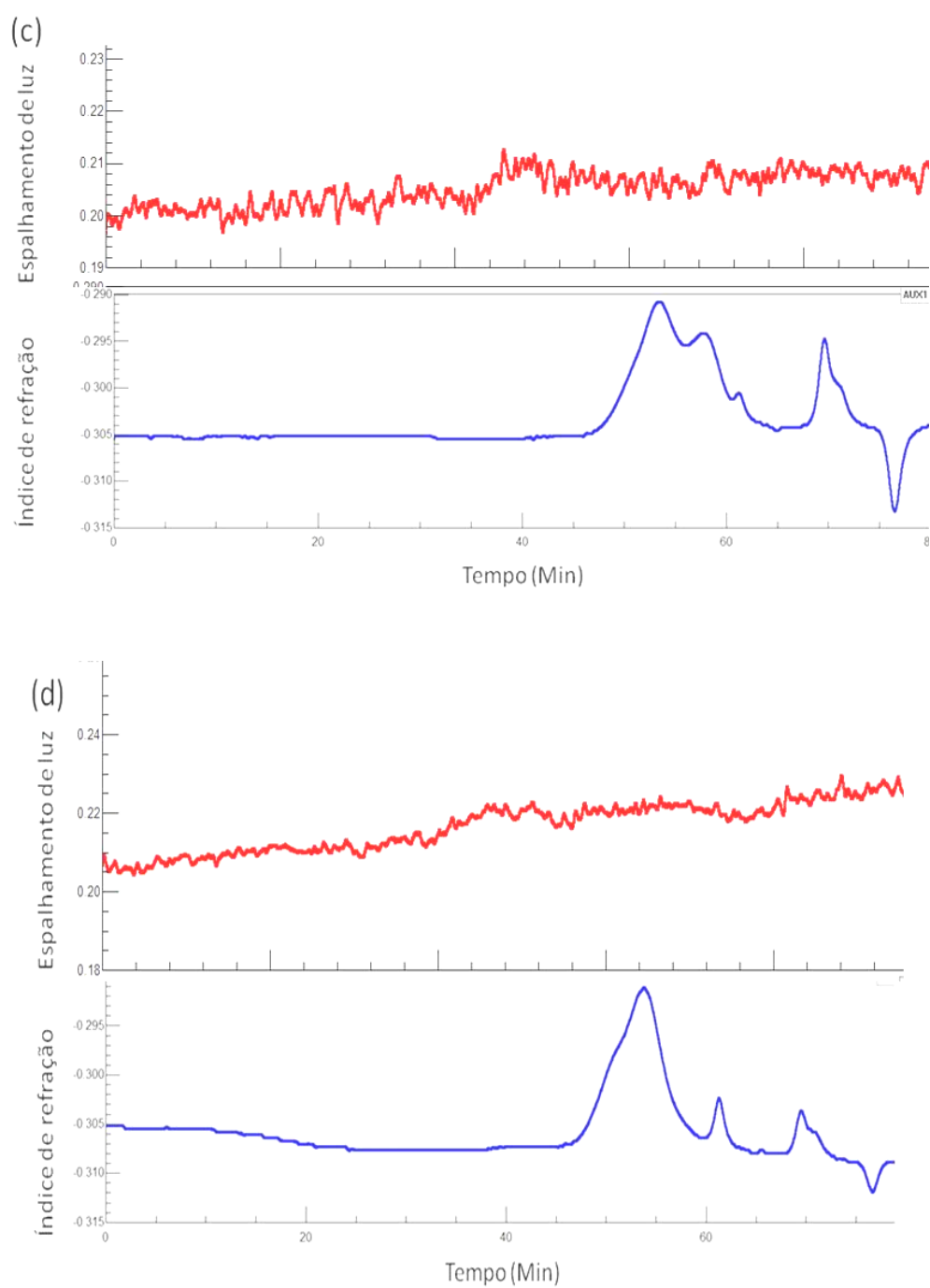


FIGURA 12: PERFIL DE ELUIÇÃO EM HPSEC-MALLS DAS FRAÇÕES EXTRAÍDAS COM NaOH 2 M DE *Aloe barbadensis* (a) A12 (b) A13 (c) A14 (d) A15

#### 6.4 Caracterização dos extratos por Ressonância Magnética Nuclear de $^{13}\text{C}$

Foram realizadas análises comparativas de RMN  $^{13}\text{C}$  dos extratos selecionados. O extrato F (1<sup>o</sup> extração aquosa realizada à temperatura ambiente – Figura 13) apresenta espectro com 8 sinais principais correspondentes às unidades de manose (monossacarídeo mais abundante neste extrato, Tabela 4) parcialmente acetilada. O sinal em 20,2 ppm é referente ao  $\text{CH}_3$  grupo acetil e em 63,0 ppm à C-6 acetilado. Tal dado já era esperado, pois é relatado na literatura que o polissacarídeo solúvel mais abundante em *A. barbadensis* é a acemanana, uma manana acetilada (Figura 14). O sinal em 100,1 ppm pode ser atribuído ao C-1 da  $\beta$ -manose, em 60,7 ao C-6 livre, e os sinais em 76,4; 75,1; 71,6 e 70,2 ppm são referentes ao C-4, C-5, C-3 e C-2, respectivamente. O sinal em 101,6 pode ser atribuídos ao C-1 da xilose.

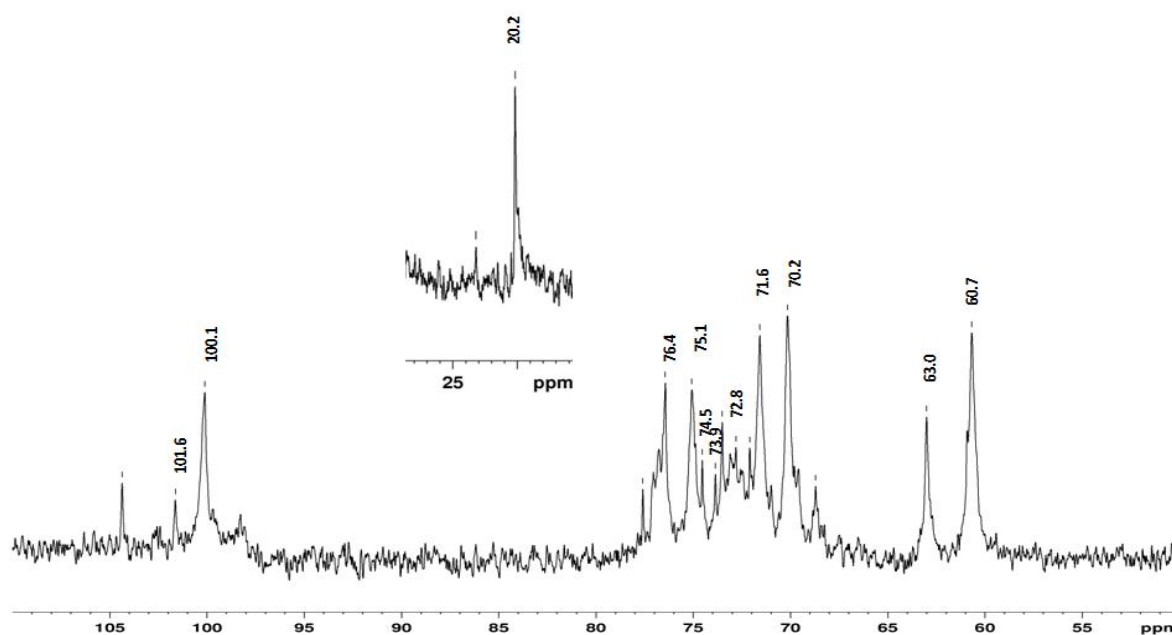


FIGURA 13: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DA FRAÇÃO F, OBTIDA A 50°C

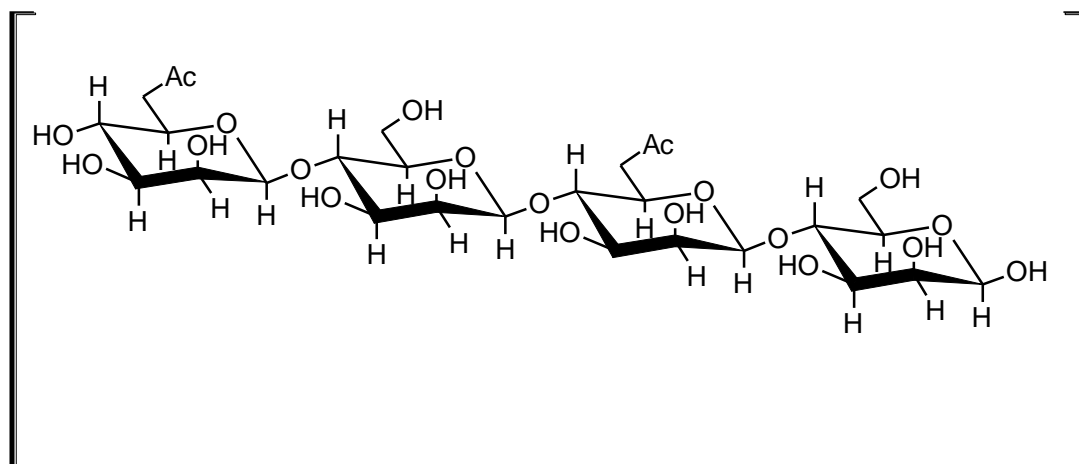


FIGURA 14: MANANA PARCIALMENTE ACETILADA

O espectro do extrato Q1 (Figura 15) apresenta sinal em 170,5 ppm, característico de grupo carboxílico metil esterificado e sinal em 52,8 ppm, atribuído ao carbono do grupo metil éster ligado ao C-6 de ácido urônico. O sinal em 100,0 ppm pode ser atribuído à C-1 de  $\alpha$ -D-galacturônico esterificados e em 16,6 ppm é referente ao C-1 da ramnose. Tais sinais estão de acordo com a literatura, indicando uma homogalacturonana com inserções de ramnogalacturonana (COZZOLINO *et al.*, 2006; MUKHIDDINOV *et al.*, 2000; TAMAKI *et al.*, 2007; WANG; LIU; FANG, 2005; VRIESMANN, 2008). A presença de ácido galacturônico foi confirmada com o experimento realizado em CCD, onde foi detectado este açúcar ácido. A composição monossacarídica também apresenta quantidade considerável de ramnose, galactose e arabinose, diferente das frações extraídas com álcali, sendo que estes monossacarídeos são característicos de pectinas.

Para confirmar estes dados, a amostra foi submetida ao experimento de RMN  $^{13}\text{C}$  diluída em  $\text{D}_2\text{O}$  com hidróxido de sódio 0,5 M (Figura 16). Nesta amostra o sinal referente ao grupo carboxílico do ácido urônico foi deslocado para 175,0 ppm, indicando que ele não está metoxilado ( $-\text{COO}^-$ ), ou seja, a ligação éster foi hidrolisada pelo ambiente alcalino a que o extrato foi submetido, e o sinal correspondente em 52,8 ppm desapareceu.

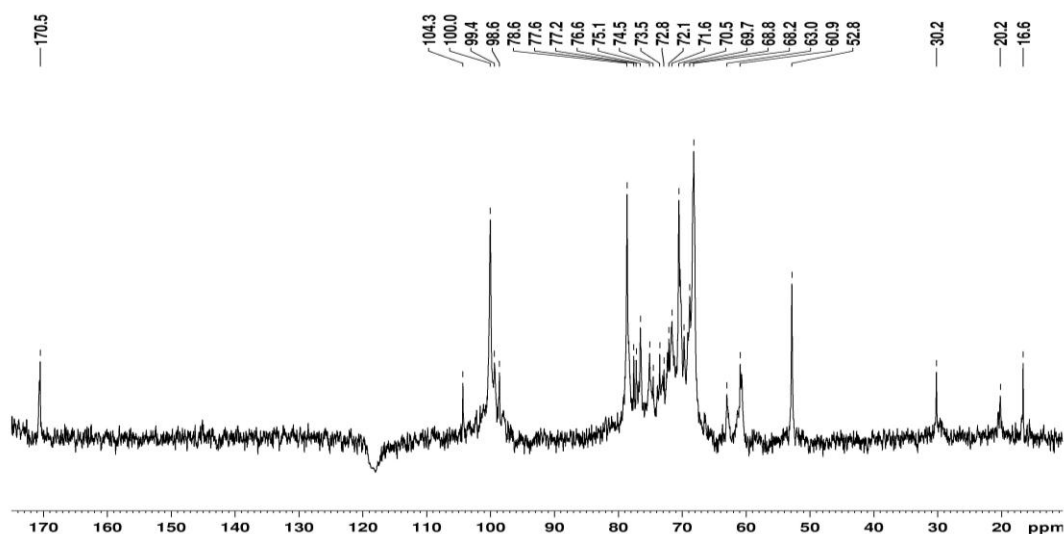


FIGURA 15: ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  RMN DA FRAÇÃO Q1, OBTIDO A 70°C

Tais dados estão de acordo com a literatura, que descreve a presença de ácidos poligalacturônicos e ramnogalacturonana (RGII) entre as pectinas de angiospermas monocotiledôneas não-comelinóides (EDASHIGE e ISHII, 1998; CARPITA e GIBEAUT, 1993).

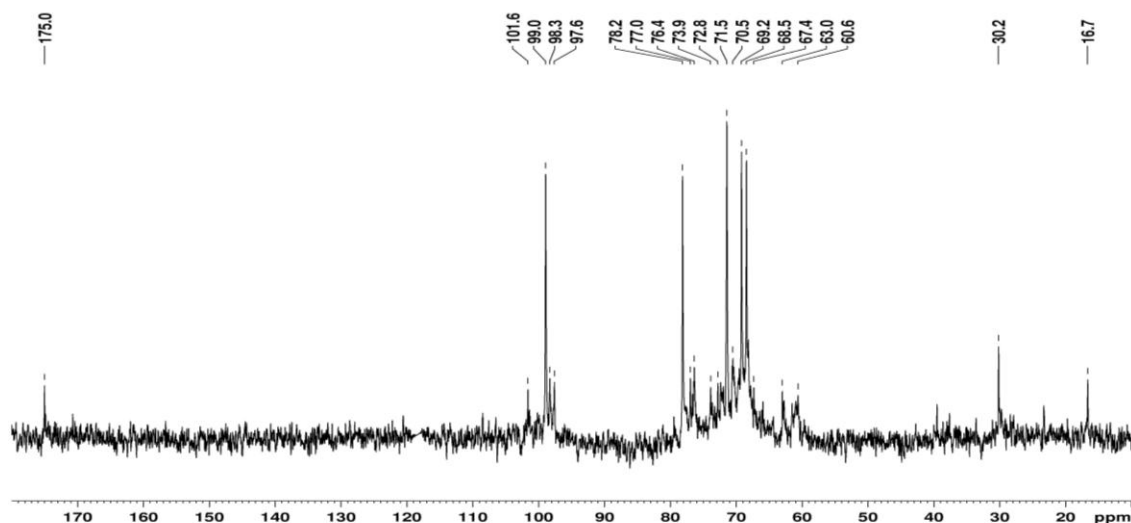


FIGURA 16: ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  RMN DA FRAÇÃO Q1, OBTIDO A 70°C, EM SOLUÇÃO ALCALINA (0,5 M)

O espectro do extrato A5 (Figura 17) apresenta uma região anomérica muito complexa com uma diversidade de sinais, no entanto estes sinais estão de acordo com sua composição monossacarídica, que apresenta xilose, manose, galactose e glucose (Tabela 4).

Tendo em vista a semelhança das amostras A3-A5 em sua composição monossacarídica, as mesmas foram agrupadas, originando a fração X-1, que foi então submetida à métodos químicos de purificação, descritos no item 6.5 (pág. 80).

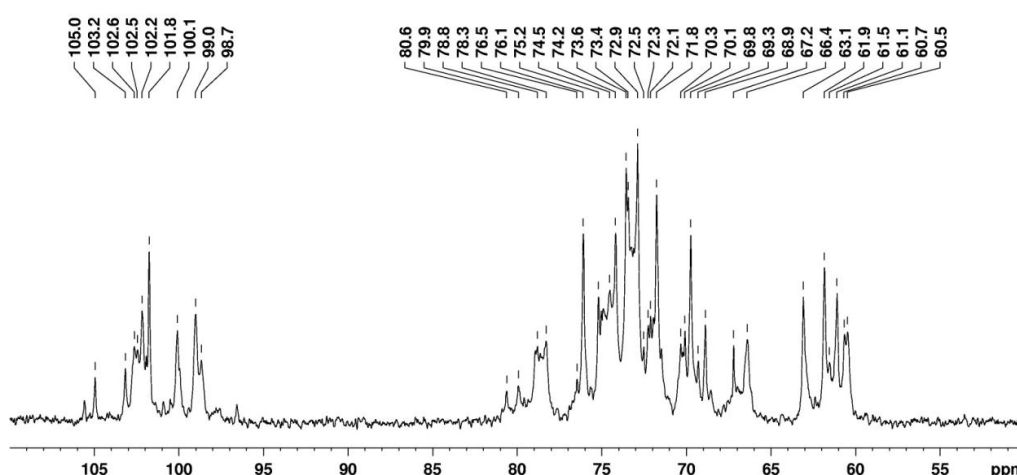


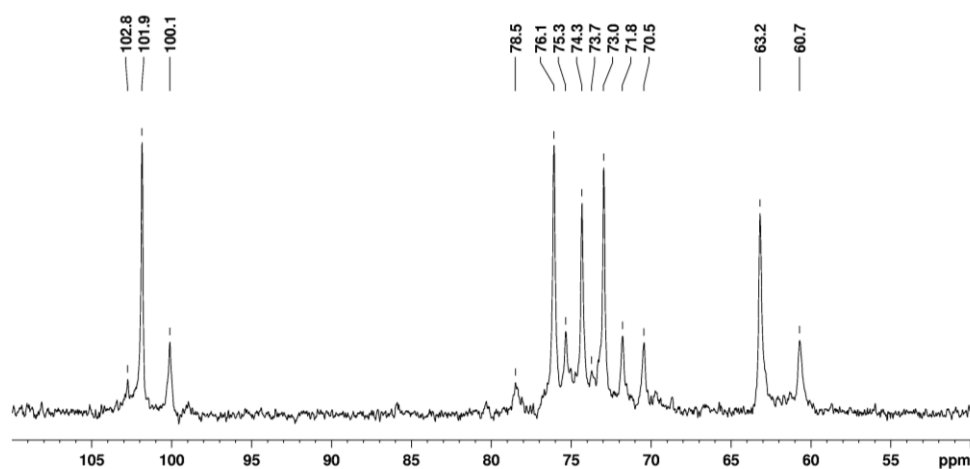
FIGURA 17: ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  RMN DA FRAÇÃO A5 OBTIDO A 50°C

Os espectros das amostras A8, A9 e A10 (Figura 18) apresentam 5 sinais de maior intensidade, o que está de acordo com a composição monossacarídica que mostra a presença de um açúcar principal, a pentose xilose (70-81 mol%). Desta forma os deslocamentos químicos em 101,8; 76,0; 74,3; 72,9 e 63,1 ppm correspondem a C-1, C-4, C-3, C-2 e C-5 de unidades de xilopiranosil (1 $\rightarrow$ 4) ligados, respectivamente.

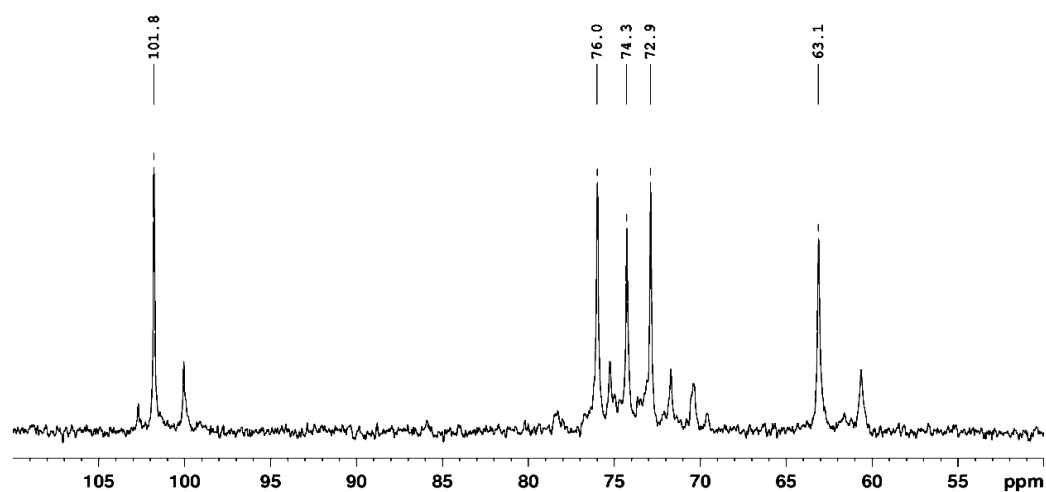
Os espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato A11 apresenta composição monossacarídica semelhante à A8-A10, apresenta 6 sinais principais, sendo estes os mesmos que aparecem com baixa intensidade nos extratos A8-A10, enquanto que os 5 sinais mais intensos em A8-A10 estão presentes com menor intensidade em A11. Tal fato pode ser atribuído ao modo como as

amostras foram preparadas para o experimento de RMN  $^{13}\text{C}$ , pois todas foram solubilizadas em NaOH 0,5 M em  $\text{D}_2\text{O}$ , no entanto o extrato A11 foi centrifugado em microcentrífuga a 10.000 rpm por 10 min, e apenas o sobrenadante foi analisado por RMN  $^{13}\text{C}$ . Este resultado sugeriu a possibilidade de utilizar o fracionamento por solubilidade como método de purificação dos extratos.

a)

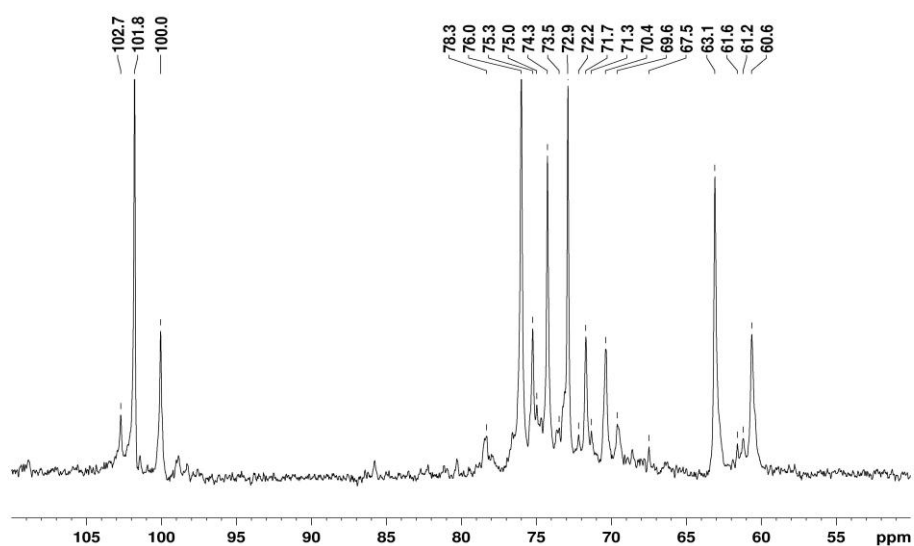


b)





c)



d)

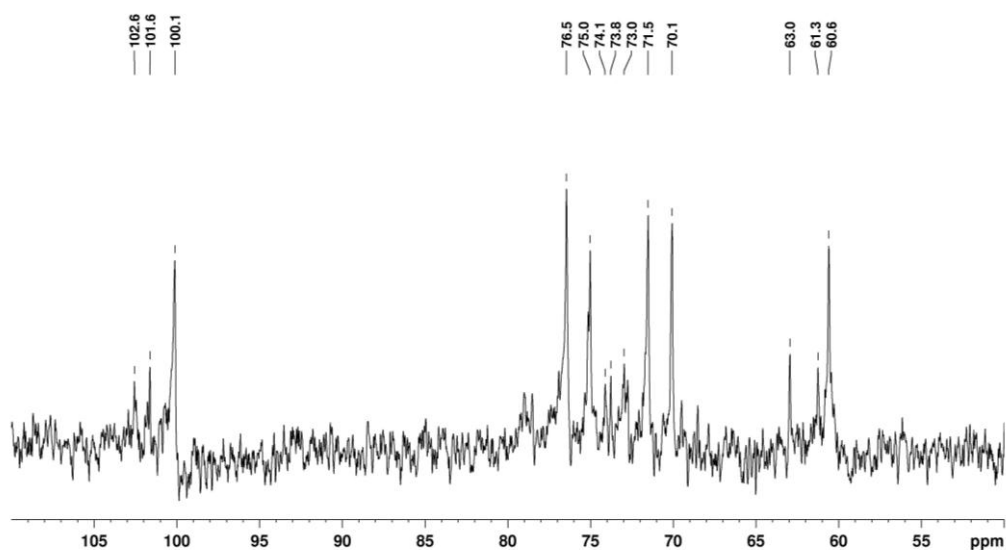


FIGURA 18: ESPECTRO DE  $^{13}\text{C}$  RMN DAS FRAÇÕES (A) A8 (B) A9 (C) A10 (D) A11 OBTIDOS A 50°C

A figura 18 mostra mais detalhadamente a semelhança dos sinais anoméricos entre A8, A9 e A10, além de composição semelhante (Tabela 4), de modo que estes foram agrupados para posterior purificação, gerando a

fração X-2. O mesmo princípio foi aplicado aos extratos A3-A5 os quais foram agrupados originando a fração X-1.

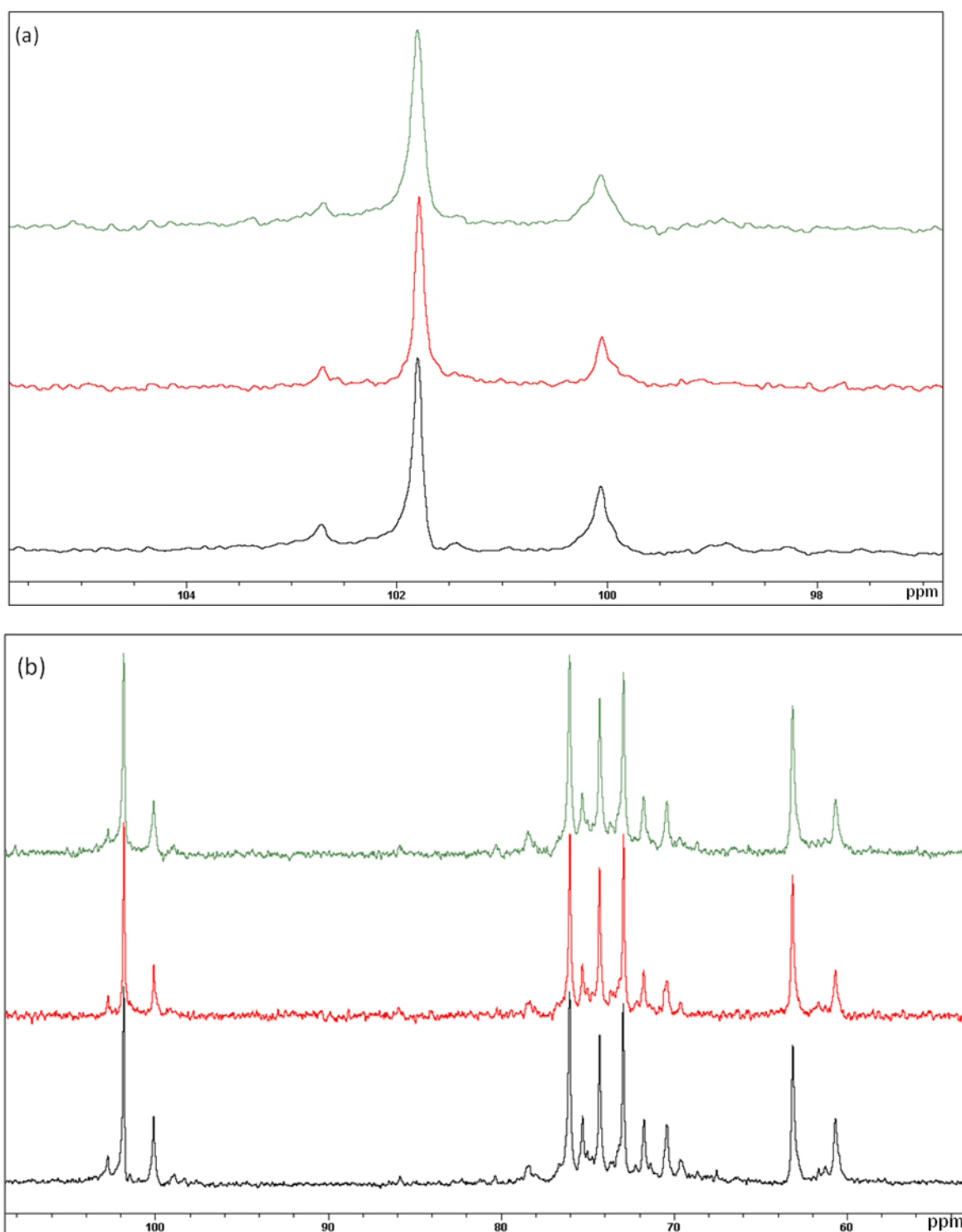


FIGURA 19: ESPECTROS DE RMN  $^{13}\text{C}$  DAS AMOSTRAS A8, A9 E A10 (a) REGIÃO ANOMÉRICA AMPLIADA (b) ESPECTRO COMPLETO DAS AMOSTRAS A8, A9 E A10

## 6.5 FRACIONAMENTO POR SOLUBILIDADE DE X-1 E X-2

### 6.5.1 Fracionamento por solubilidade de X-1

A fração X-1 foi submetida a fracionamento por solubilidade em água onde a fração X-1 obteve 41% de rendimento no sobrenadante (X-1-S) e 52% de rendimento do precipitado (X-1-P) em relação ao peso inicial submetido ao processo. A fração X-1-S foi diretamente submetida ao processo de precipitação de Fehling, conforme descrito no 6.6.1.

### 6.5.2 Fracionamento por solubilidade de X-2

A fração X-2 foi submetida a fracionamento por solubilidade em água onde obteve 51% de rendimento no sobrenadante (X-2-S) e 30% de rendimento no precipitado (X-2-P) em relação ao peso inicial. Ambas as frações foram submetidas à análise de composição monossacarídica e RMN  $^{13}\text{C}$ , e em seguida, a fração X-2-S também foi submetida ao processo de precipitação de Fehling.

De acordo com a composição monossacarídica (Tabela 5), é observado que a fração X-2-S apresenta maior quantidade de manose, seguida de glucose, enquanto que a fração X-2-P apresenta predominantemente xilose em sua composição, o que sugere que a xilana, molécula visualizada claramente no RMN  $^{13}\text{C}$  de A8-A10 precipitou com o processo. De modo que a fração X-2-P foi submetida ao processo de metilação (Item 6.5.2.1).

TABELA 5: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE X-2-, X-2-S E X-2-P

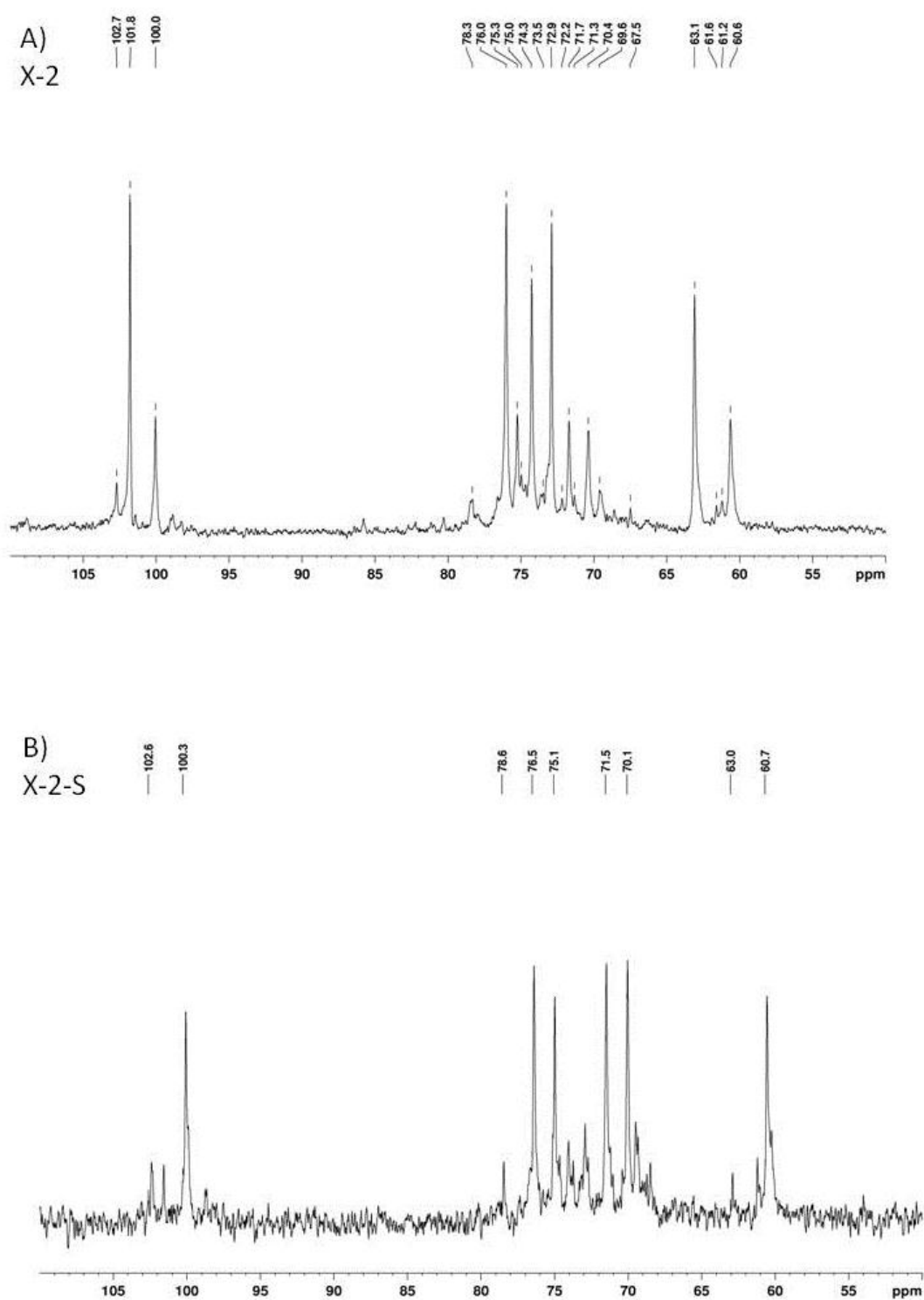
Fração	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol % <sup>b</sup> )							
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
X-2	Tr <sup>c</sup>	Tr	3,6	Tr	77,6	12,4	1,4	5,0
X-2-S	3,1	1,7	2,0	Tr	13,4	50,8	6,8	20,2
X-2-P	Tr	Tr	Tr	8	73,6	5,2	Tr	11,6

<sup>a</sup>: Analisado por GLC após hidrólise total (TFA 2M, 120°C, 2h), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação

<sup>b</sup>: Percentual relativo às áreas de todos os picos

Tr: Traços ( $\leq 1\%$ )

Na figura 20, observa-se o espectro de RMN <sup>13</sup>C de X-2 e X-2-S, e é notável que o material que fica solúvel após a centrifugação (X-2-S) apresenta espectro característico de manana, com 6 picos de maior intensidade, e de acordo com a composição monossacarídica a manose é o monossacarídeo predominante. O espectro de X-2-P não é apresentado pois apresentou muitos ruídos devido à insolubilidade da amostra, o que pode indicar que a interação com outros polissacarídeos é importante para sua solubilização.

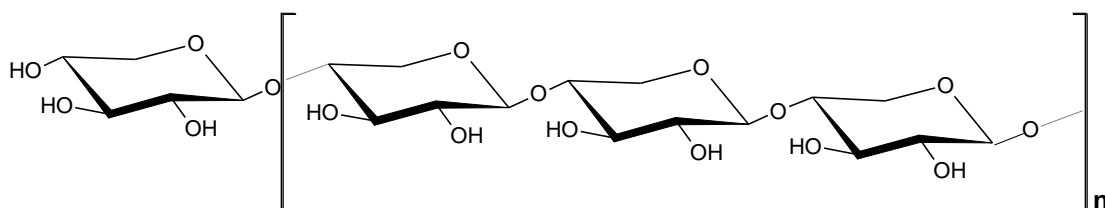
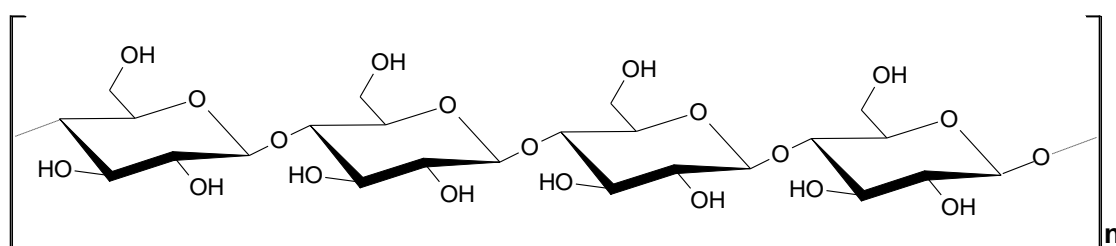
FIGURA 20: ESPECTROS DE RMN  $^{13}\text{C}$  DE A) X-2 B) X-2-S

### 6.5.2.1 Análise de metilação de X-2-P

A análise de metilação de X-2-P (Tabela 6) foi condizente com o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 19 a) de X-2, devido à presença dos derivados 2,3-Me<sub>2</sub>-Xyl (68%) referentes à cadeia principal de  $\beta$ -D-Xyl (1 $\rightarrow$ 4) ligada, derivados 2,3,4 Me<sub>3</sub>-Xyl (12%) referentes aos terminais não-redutores de  $\beta$ -D-xylp. Estes resultados juntamente com os de RMN confirmam a presença de uma  $\beta$ -xilana (1 $\rightarrow$ 4)-ligada linear (Figura 21). A amostra apresentou também 20% de derivados 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc, referentes a uma cadeia de Glc (1 $\rightarrow$ 4)-ligada. Visto que a xilose não apresentou derivados monometilados, pode-se concluir que os derivados trimetilados de glucose são referentes à uma glucana (1 $\rightarrow$ 4)-ligada (Figura 22), que por ser insolúvel, precipitou com a xilana (Figura 22)..

TABELA 6: PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANALISE DE METILAÇÃO DE X-2-P

Acetatos de alditóis parcialmente O-metilado	Mol %	Tipo de ligação	Polissacarídeo correspondente
2,3-Me <sub>2</sub> -Xyl	68	( $\rightarrow$ 4-Xylp-1 $\rightarrow$ )	Cadeia principal de xilana
2,3,4 Me <sub>3</sub> -Xyl	12	Xylp-1 $\rightarrow$	Terminal não redutor da xilana
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	20	( $\rightarrow$ 4-Glcp-1 $\rightarrow$ )	Cadeia principal de glucana

FIGURA 21: ESTRUTURA QUÍMICA DE XILANA  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-LIGADAFIGURA 22: ESTRUTURA QUÍMICA DE GLUCANA (1 $\rightarrow$ 4)-LIGADA

A presença de xilana com ligações  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) está de acordo com a literatura, que relata a presença abundante desta na parede celular de angiospermas mono- e dicotiledôneas na mucilagem celulósica e, em menor quantidade, na parede celular (NORTHCOTE, 1972).

## 6.6 PRECIPITAÇÃO DE FEHLING

### 6.6.1 Precipitação de Fehling da fração X-1-S

A fração X-1-S (sobrenadante da fração X-1) foi submetida à precipitação de Fehling, originando um sobrenadante, a fração X-1-SF (rendimento de 8,3%) e um precipitado, a fração X-1-PF (rendimento de 28%). Esta última apresenta perfil de eluição por HPSEC (Figura 23) do Precipitado de Fehling (X-1-PF) mostrou um pico principal (entre 45 e 55 min) detectado pelo índice de refração (RID) mas não detectado pelo espalhamento de luz

(MALLS), indicando a presença de uma fração polissacarídica de baixo peso molar.

A tabela 7 apresenta a composição monossacarídica da fração X-1-PF

TABELA 7: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE X-1-PF (MOL%)

Extrato	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol % <sup>b</sup> )							
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
X-1-PF	Tr	5,4	Tr	10,2	25,2	4,1	9,3	45,8

<sup>a</sup>: Analisado por GLC após hidrólise total (TFA 2M, 120°C, 2h), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação

<sup>b</sup>: Percentual relativo às áreas de todos os picos

Tr: Traços ( $\leq 1\%$ )

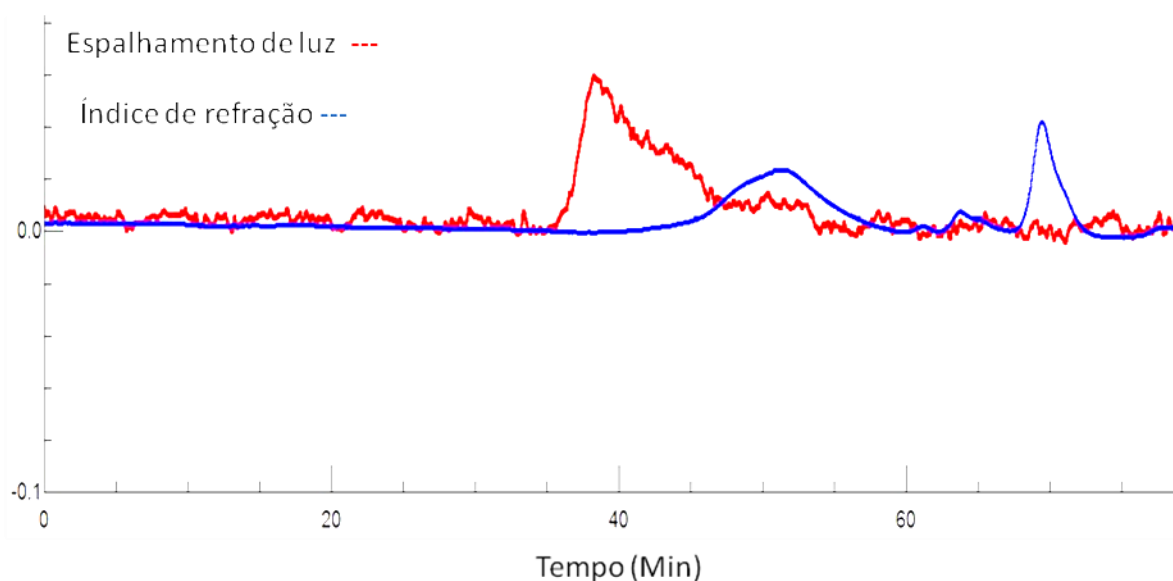


FIGURA 23: PERFIL DE ELUIÇÃO DE X-1-PF EM HPSEC-MALLS

Ao analisar o RMN 2D HSQC (Figura 24), juntamente com a composição monossacarídica, observa-se na região anomérica as correlações em 104,4/4,56 ppm, correspondente a  $\beta$ -Galp terminal, em 103,2/4,62 ppm correspondente a  $\beta$ -Galp interna ou substituída, em 102,3/4,55 correspondente à  $\beta$ -Glc terminal, em 101,6/4,49 ppm correspondente ao C-1 da fucose, 100,1ppm referente à C-1 da manose, em 99,4/5,28 ppm correspondente ao C-



1 de  $\alpha$ -Xylp e em 98.8/5,13 ppm, correspondente ao C-1 de Xylp interna (BUSATO, et al, 2001; PAREDES, 2009; LIMA, et al, 1993; GOUVÊA, 2008).

Outros sinais podem ser identificados, como 79.1, referente à C-2 de  $\beta$ -Araf (TEIXEIRA, 2009), 77.3 ppm referente à C-2 de  $\alpha$ -D-Xylp (1 $\rightarrow$ 4) ligada com ramificação de Glc em C-2 (DINAND, VIGON, 2001), 73.8 ppm referente à C-3 de Glcp, 70.1, 69.5 e 62.7 ppm referentes a C-6 de Glcp (GOUVÊA, 2008, TEIXEIRA, 2009), 66.2 ppm referente a C-6 de Glcp (BUSATO, et al, 2001; PAREDES, 2009), e sinais entre 60.1 e 60.6 ppm correspondentes à C-6 de Galp e Manp, 61.1-61.6 ppm correspondentes à C-6 de Glcp livre e 62.7-62.9 ppm ao C-5 de  $\alpha$ -Xylp (BUSATO, et al, 2001; PAREDES, 2009).

CUTILLAS-ITURRALDE et al. (1998), BUSATO (2001) e PAREDES (2009) identificaram o derivado correspondente a Manp ligada (1 $\rightarrow$ 4) nos produtos de metilação de xiloglucanas purificadas. BOOTTEN, et al, 2004, encontrou 2,8% de manose em meio a xiloglucanas. Considerando que a relação Glc:Xyl:Gal:Fuc encontrada (10:5,5:2:1,4) é relativamente parecida à encontrada na literatura (10:6:3,4:1,4) (CUTILLAS-ITURRALDE et al.,1998) e (10:5,7:2,5:2.9) (BOOTTEN, et al., 2004) pode-se sugerir a presença de uma molécula com cadeia principal composta de Glcp substituída em O-6 por Xylp, sendo que parte destas são substituídas em O-2 por D-Galp, e algumas D-Galp apresentam fucose terminal, atribuindo a presença de manose na composição monossacarídica como contaminação.

De acordo com a literatura, xiloglucanas de angiospermas tem demonstrado variação na composição das cadeias laterais, algumas não contém fucose, outras contém  $\alpha$ -L-Ara ligadas à xilose na posição 2, contém pouca fucose e são pouco substituídas (POPPER; FRY, 2004).

A estrutura sugerida é diferente da relatada na literatura para angiospermas monocotiledôneas - sem fucose terminal, pouca xilose e galactose terminais e poucas unidades de xilose substituídos (HAYASHI, 1989).

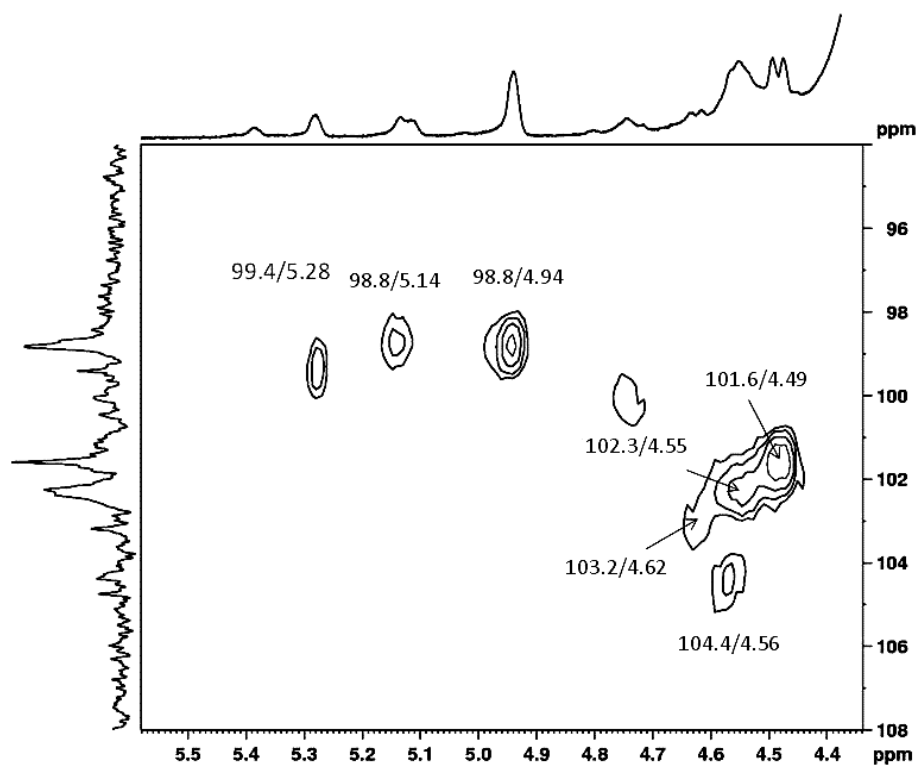


FIGURA 24: ESPECTRO DE RMN 2D HSQC DE X-1-PF OBTIDO A 50°C

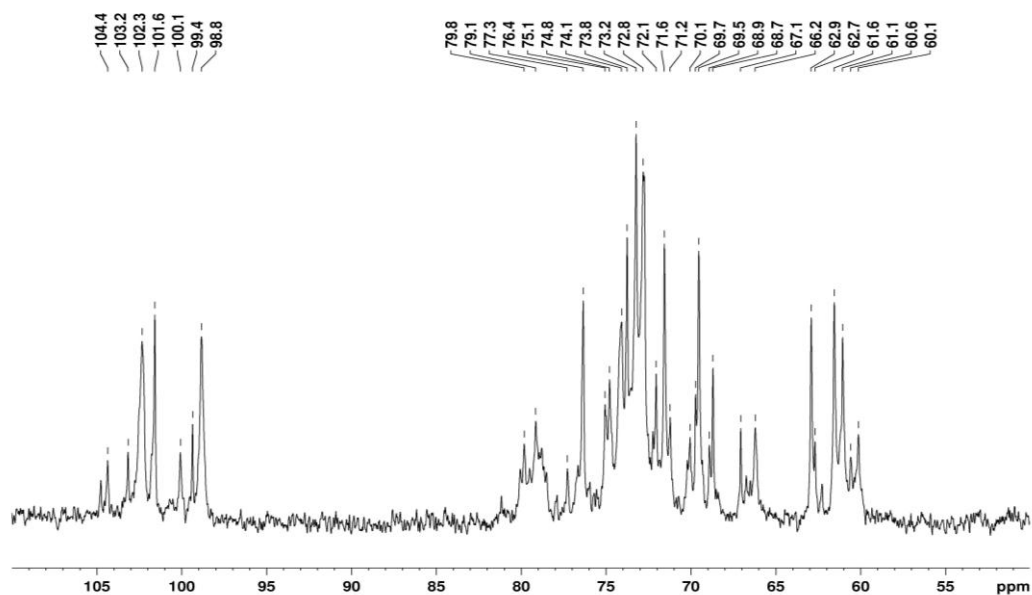


FIGURA 25: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  X-1-PF OBTIDO A 50°C

### 6.6.2 Precipitação de Fehling da fração X-2-S

A fração X-2-S obtida através de fracionamento por solubilização em água e centrifugação (conforme descrito no item 5.3) foi submetida ao fracionamento por precipitação de Fehling originado a fração X-2-PF. A amostra X-2-PF apresenta em sua composição monossacarídica predominância de manose e glucose, com menor quantidade de galactose, xilose e arabinose (Tabela 8). Seu perfil de eluição obtido por HPSEC-MALLS apresentam dois picos, um mais estreito entre 65 e 75 minutos e um mais alargado entre 45 e 60 minutos (Figura 26).

TABELA 8: COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE X-2-PF (MOL%)

Extrato	Composição monossacarídica <sup>a</sup> (mol % <sup>b</sup> )							
	Rha	Fuc	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
X-2-PF	Tr	-	Tr	6,5	13,9	50,6	8,3	20,7

<sup>a</sup>: Analisado por GLC após hidrólise total (TFA 2M, 120°C, 2h), redução (NaBH<sub>4</sub>) e acetilação

<sup>b</sup>: Percentual relativo às áreas de todos os picos

Tr: Traços ( $\leq 1\%$ )

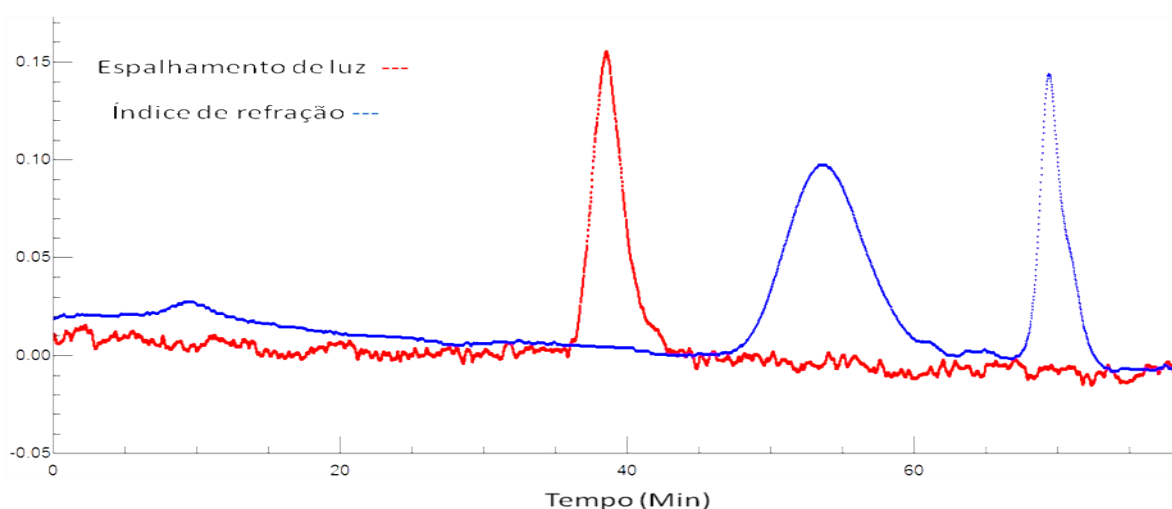


FIGURA 26: PERFIL DE ELUIÇÃO DE X-2-PF EM HPSEC-MALLS

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de X-2-PF (Figura 25) apresenta 6 picos de maior intensidade, o que está de acordo com sua composição, onde o monossacarídeo predominante é a manose (50,6%), seguido de glucose (20,7%). Os sinais atribuídos à manose são 100.2 (C-1); 76.4 (C-4); 75.1 (C-5); 71.7 (C-3), 70.1 (C-2) e 60.7 (C-6) ppm. Os sinais anoméricos em 98.9; 101.7 e em 102.5 ppm foram atribuídos ao C-1 de  $\alpha$ -Gal (1 $\rightarrow$ ), C-1 da  $\beta$ -D-Xyl e ao C-1 da  $\beta$ -Glc, respectivamente.

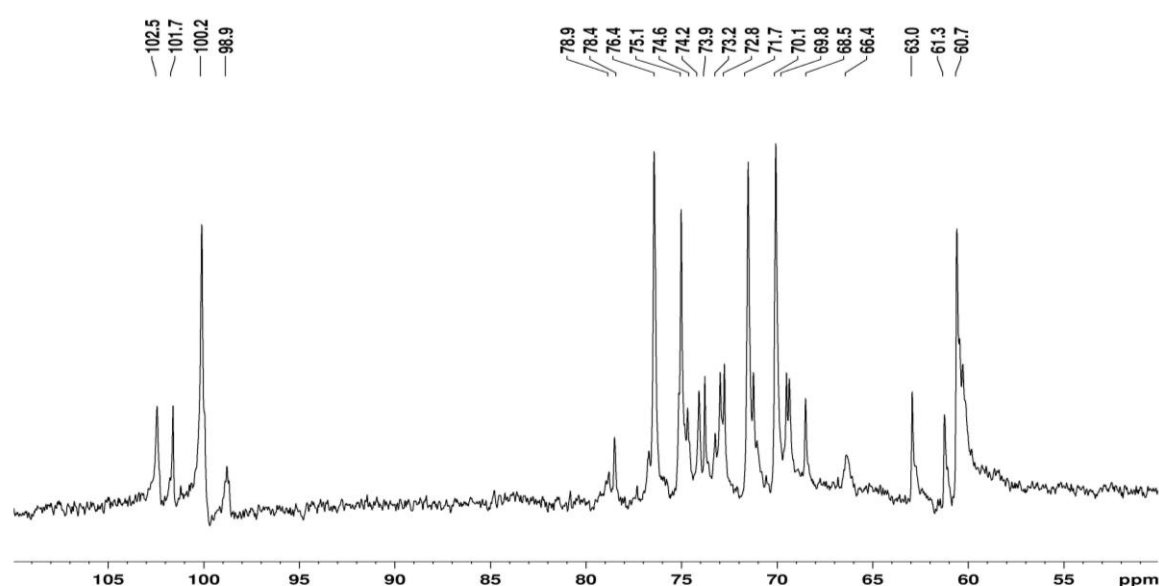


FIGURA 27: ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DE X-2-PF A 50°C

Considerando que a literatura relata a presença abundante de galactoglucomanana entre polissacarídeos estruturais de angiospermas (BIAN *et al*, 2010), pode se sugerir a presença de uma galactoglucomanana (GGM).

#### 6.6.2.1 Análise de metilação de X-2-PF

A análise de metilação da fração X-2-PF (Tabela 10) demonstrou a presença de 60% de 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Man, referente à manose (1 $\rightarrow$ 4)-ligada da

cadeia principal, 15% de derivados 2,3,6-Me<sub>3</sub>-Glc referentes à Glc (1→4)-ligadas e derivados 2,3,4,6-Me<sub>4</sub>-Gal referentes à galactose como terminais não-redutores. Estes resultados sugerem a presença de uma galactoglucomanana. A amostra apresentou também 15% de derivados 2,3 – Me<sub>2</sub>-Xyl, correspondente a xilana 4-ligada.

TABELA 9: PERFIL DOS ACETATOS DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR ANÁLISE DE METILAÇÃO DE X-2-P

Acetato de alditóis parcialmente O-metilado	Mol %	Tipo de ligação	Polissacarídeo Correspondente
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Glc	15	Glc (1→4) I	Cadeia principal de Glucose 4-ligada
2,3,6-Me <sub>3</sub> -Man	60%	Man (1→4)	Cadeia principal de manose 4-ligada
2,3,4,6-Me <sub>4</sub> -Gal	10%	Gal (1→	Terminal não redutor
2,3 Me <sub>2</sub> -Xyl	15%	Xyl (1→4)	Xilana 4-ligada

A localização da GGM indica que é um componente estrutural de *A. barbadensis*, o que está de acordo com a literatura. BIAN *et al.* (2010) e SILVA *et al.* (2009) relatam a presença de GGMs em angiospermas.

GGMs são descritas como unidades de D-manopiranosil e D-glucopiranosil ligados (1→4), carregando unidades de D-galactopiranosil na posição O-6 de unidades de D-manose ou D-glucose. Embora a porcentagem equivalente do derivado dimetilado 2,3-Me<sub>2</sub>-Hexose não tenha sido encontrado confirmando os pontos nos quais as unidades de galactose estão ligadas à cadeia principal, isto pode ser atribuído ao baixo grau de ramificação da molécula (menor que 10%) (CAPEK *et al.*, 2000; EBRINGEROVÁ *et al.*, 2008; HANNUKSELAA e PENHOAT. 2004).

As Figuras 28 e 29 apresentam as estruturas propostas para a galactoglucomanana e a xilana de acordo com os resultados da metilação, frisando que a descrição destas estruturas é inédita na literatura para a espécie *Aloe barbadensis*.

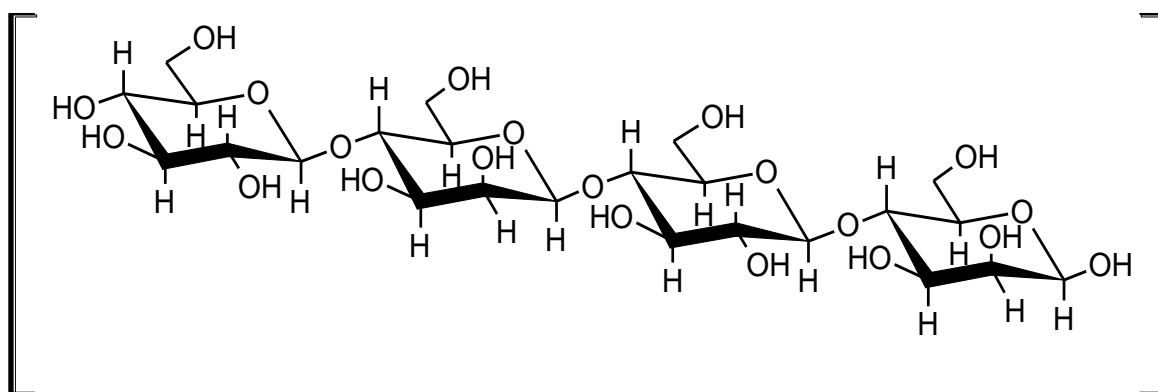


FIGURA 28: ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA GLUCOMANANA

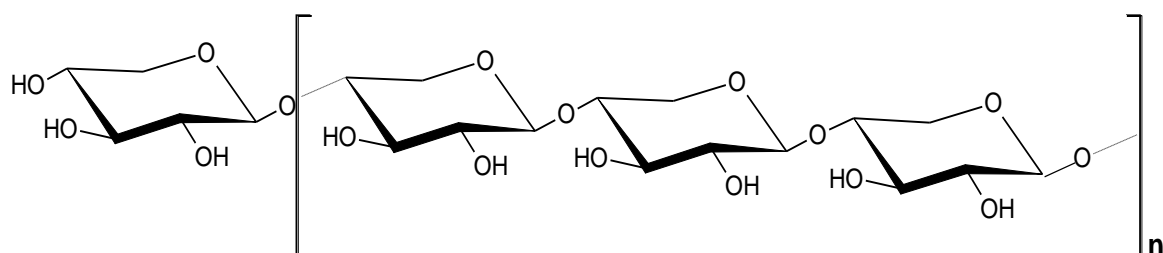


FIGURA 29: ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA XILANA B-(1→4)-LIGADA

## 7 CONCLUSÕES

Da fração fibrosa do gel de *A. barbadensis* foram isolados diferentes tipos de polissacarídeos.

Na fração aquosa, foi caracterizada a presença de uma  $\beta$ -manana (1 $\rightarrow$ 4)-ligada principalmente acetilada em C-6.

No extrato aquoso à quente foi caracterizada a presença de pectinas, do tipo ácidos poligalacturônico.

Nos extratos alcalinos, houve predominância de xilana (1 $\rightarrow$ 4)-ligada.

HPSEC-MALLS das frações extraídas com álcali indicam a presença de hemiceluloses de baixa massa molecular.

Os extratos alcalinos mostraram predominância de xilose em sua composição;

Nos extratos alcalinos, foi caracterizada a presença de uma xilana linear  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-ligada;

A Precipitação de Fehling do extrato alcalino (NaOH 0,5 M) permitiu o isolamento de uma xiloglucana composta por uma cadeia principal de glucose com ramificações de xilose;

A Precipitação de Fehling do extrato alcalino (NaOH 2 M) permitiu o isolamento de uma galactoglucomanana cuja cadeia principal é composta de glucose e manose ligadas (1 $\rightarrow$ 4) numa proporção de 1,5:6.

A caracterização química da xilana, xiloglucana e galactoglucomanana em *Aloe barbadensis* são inéditas na literatura.

## REFERENCIAS

ALBERSHEIM, P., DARVILL, A.G., O'NEILL, M.A., SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. An hypothesis: The same six polysaccharides are components of the primary cell walls of all higher plants. In: **Pectins and Pectinases**. Elsevier Science, p.47-53, 1996.

AKINMOLADUN, A.C.; AKINLOYE, O. Prevention of the onset of hyperglycaemia by extracts of *Aloe barbadensis* in rabbits treated with alloxan. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 8, p. 1028-1030, 2007.

AMOROZO, M. C de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta bot. Bras.**, v. 16, n. 2, p. 189-203, 2002.

ANGONE et al. Structural characterization of cell wall polysaccharides from two plant species endemic to central Africa, *Fleurya aestuans* and *Phragmenthera capitata*. **Carbohydrate polymers**, v. 75, n.1, p. 104-109, 2009.

ANNISON, G.; CHOCT, M.; CHEETHAM, N. W. Analysis of wheat arabinoxylans from a large-scale isolation. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 151-159, 1992.

AVIGAD, G.; DEY, P.M. Carbohydrate Metabolism: Storage Carbohydrates. In: Dey, P.M.; Harborne, J.B. **Plant Biochemistry**. Academic Press, San Diego, p. 143-204, 1997.

BABA, K., SONE, Y., MISAKI, A.; HAYASHI, T. Localization of xyloglucan in the macromolecular complex composed of xyloglucan and cellulose in pea stems. **Plant and Cell Physiology**, v. 35, n. 3, p. 439-444, 1994.

BALSUBRAMANIAM, S., MITROPOULOS, K. A., MYANT, N. B. Evidence for the compartmentation of cholesterol in rat liver microsomes. **Eur. J. Biochem.**, v. 34, p. 77-83, 1973.

BENGTSSON, S.; AMAN, P.; ANDERSSON, R.E. Structural studies on water-soluble arabinoxylans in rye grain using enzymatic hydrolysis.



**Carbohydrate Polymers**, v. 17, p. 277-284, 1992.

BIAN et al. Isolation and fractionation of hemicelluloses by graded ethanol precipitation from *Caragana Korshinskii*. **Carbohydrate Research**, v. 345, p. 802-809, 2010.

BJORKHEM, I.; DANÅ'LSSON, H. 7-ot-hydroxylation of exogenous and endogenous cholesterol in rat liver microsomes. **Eur. J. Biochem.**, v. 53, p. 63-70, 1985.

BIKOVA, T.; TREIMANIS, A. Solubility and molecular weight of hemicelluloses from *Alnus incana* and *Alnus glutinosa*. Effect of tree age. **Plant Physiol. Biochem.**, v 40, p. 347-353, 2002.

BOCHICCHIO, R.; REICHER, F. Are hemicelluloses from *Podocarpus lamberti* typical of gymnosperms? **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 127-136, 2003.

BOOTTEN et al. Solid-state <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy shows that the xyloglucans in the primary cell walls of mung bean (*Vigna radiata* L.) occur in different domains: a new model for xyloglucan±cellulose interactions in the cell wall. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 397, p. 571-583, 2004.

BOOTTEN et al. WAXS and <sup>13</sup>CNMR study of *Gluconoacetobacter xylinus* Cellulose in composites with tamarind xyloglucan. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 221–229, 2008.

BOWLES, J. D. Defense-related proteins in higher plants. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 59, p. 873-907, 1990.

BOZZI, A, et al. Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. **Food Chemistry**, v. 103, p. 22–30, 2007.

BRETT, C.; WALDRON, K. Physiology and Biochemistry of plant Cell Walls, **Unwin Hyman**, v.114, p. 1-3, , 1990.

BRIENZO, M; SIQUEIRA, A.F.; MILAGRES, A.M.F. Search of optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical**

**Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.

BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM W.; JONES, R.L. Biochemistry & molecular biology of plants. **Plant Growth Regulation**. v. 35, n. 1, p. 105-106, 2001.

BUSATO, A.P; VARGAS-RECHIA, C. G.; F. REICHER. Xyloglucan from the leaves of *Hymenocallis courbailii*. **Phytochemistry**. v. 58, p. 525-531, 2001.

CAPEK, P. et al. Galactoglucomannan from the secondary cell wall of *Picea abies* L. Karst. **Carbohydrate Research**, v. 329, p.635-645, 2000.

CAPÓ, J. T. et al. Efecto del extracto acuoso de Aloe vera (L.) N. L. Burm. sobre indicadores lipídicos de suero de conejo. **Rev Cubana Plant Med**,. v.13, n.4, 2008.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). Biochemistry and Molecular Biology of plants. **American Society of Plant Physiologists**, Rockville, Maryland, p. 52-108, 2000.

CARPITA, N.C.; GIBEAUT, D.M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. **The plant journal**, v. 3, n. 1, p.1-30, 1993.

CARVAJAR-MILLAN, E., et al. Arabinoxylan /protein gels: structural, rheological and controlled release properties. **Food Hydrocolloids**, v. 22, n. 1, p. 53-61, 2006.

CERQUEIRA, P. M. de. et. al. Efeito da farinha de semente de abóbora (*Cucurbita maxima*, L.) sobre o metabolismo glicídico e lipídico em ratos. **Rev. Nutr.**, v. 21, n.2, p.129-136, 2008.

CHEREM, A. DA R.; BRAMOSRKI, A. Excreção de gordura fecal de ratos (*Rattus norvegicus*, Wistar), submetidos a dietas hiperlipídicas e hipercolesterolêmicas suplementadas com quitosana. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 44, n.4, p. 702-706, 2008.

CHOW, J.T-N, WILLIAMSON, D.A., YATES, K.M., GOUX, W.J. Chemical Characterization of the Immunomodulating Polysaccharide of Aloe Vera. **Carbohydr. Research.**, v. 340, n. 6, p. 1131-1142, 2005.

CIUCANU, I.; KEREK, F. A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 131, p. 209-217, 1984.

COZZOLINO, R. et al. Structural analysis of the polysaccharides from *Echinacea angustifolia* radix. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 263-272, 2006.

CUTILLAS-ITURRALDE, A., PENA, M.J., ZARRA, I., LORENCES, E.P.A xyloglucan from persimmon fruit cell walls. **Phytochemistry**, v.48, n. 4, p. 607–610, 1998.

DAVIDSON, et al. A Low-Viscosity Soluble-fiber Fruit Juice Supplement Fails to Lower Cholesterol in Hypercholesterolemic Men and Women. **The Journal of Nutrition**, v. 12, n. 11, p. 1927-1932, 1998.

Dietary Fiber. ILSI Europe Concise Monograph Series. **Brussels, Belgium**: ILSI Press, 1994, p. 15–19.

DINAND, E.; VIGON, M.R. Isolation and NMR characterization of a (4-O-methyl-D-glucurono)-D-xylan from sugar beet pulp. **Carbohydrate Research**, v. 330, p. 285–288, 2001.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v. 28, p. 350-356, 1956.

EBRINGEROVÁ, A. et al. Norway spruce galactomannans exhibiting immunomodulating and radical-scavenging activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 1-5, 2008.

EDASHIGE, Y; ISHII, T. Ramnagalacturonan II from cell walls of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, v. 49, N. 3, p. 681-690, 1998.

FANG, J. M.; SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; FOWLER, P. Acetylation of

wheat straw hemicelluloses B in a new non-aqueous swelling system. **Carbohydrate Polymers**, v. 41, p. 379-387, 2000.

FEMENIA, A., et al. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 397-405, 2003.

FIETZ, V. R.; SALGADO, J. M. Efeito da pectina e da celulose nos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidêmicos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 19, n.3, 1999.

FILIZETTI-COZZ, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measuramnet or uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v. 197, p. 157-162, 1991.

FOGLIO, M.A., et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo multidisciplinar. Construindo a História dos Produtos Naturais. [http://www.multiciencia.unicamp.br/art04\\_7.htm](http://www.multiciencia.unicamp.br/art04_7.htm), acesso em 06/01/2011.

FRANÇA, S.X. de F., et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plants medicinais. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 61, n. 2, p. 201-208, 2008.

FRY, S.C. Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. **New Phytologist**, v. 161, n.3, p.641-675, 2004.

GABRIELI, I. Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicellulose from aspen wood. **Carbohydrate polymers**, v. 43, p. 367-374, 2000.

GOUVÊA, M.R. de. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas viscoelásticos utilizando polissacarídeos e íons borato: aplicação em pastas de cimento portland**. 123 f. tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

HANNUKSELA, T.; PENHOAT, C. H. du. MNR structural determination of dissolved O-acetylated galactoglucomannan isolated from spruce thermomechanical pulp. **Carbohydrate Research**, v. 339, p. 301-312, 2004.

HARRIS, P.J. Primary and secondary plant cell walls: A comparative overview. **New Zealand Journal of Forestry Science**, v. 36, n. 1., p. 36-53, 2006.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, Orlando, v. 48, p. 422-427, 1972.

HAYASHI, T. Xyloglucans in the primary cell wall. Annu. Rev. Plant Physiol. **Plant Mol.**, v. 40, p. 139-168, 1989.

HELDT, H. **Plant Biochemistry**. 3 Ed, 2004.

HOFFMAN, M., et al. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass Asteridae. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1826-1840, 2005.

JACOBS, A., et al. Isolation and characterization of water-soluble hemicelluloses from flax shive. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 1869-1876, 2003.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. Methods **Carbohydr. Chem.**, v. 5, p. 36-38, 1965.

JUNIOR, J.F. de O. Isolamento de oligossacarídeos de xiloglucano de dicotiledôneas através de hidrólise enzimática e cromatografia de exclusão molecular. **Rev. bras. Bot.**, v. 29 n.3, 2006.

KAKEGAWA, K.; EDASHIGE, Y.; ISHI, T. Xyloglucan from xylem-differentiating zones of *Cryptomeria japonica*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 767-771, 1998.

KUBAČKOVÁ, M., et al. Structure of galactoglucomannan from *Populus monilifera* H. **Carbohydrate Polymers**, v. 19, p. 125-129, 1992.

LIMA, N.N.; REICHER, F.; CORRÊA, J.B.C.; GANTER, J.L.M.S.; SIERAKOWSKI, M.-R. Partial structure of a xyloglucan from the seeds of *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (jatobá). **Cien. Cult.**, v.

45, n. 1, p. 22-26, 1993.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 1, p. 193-265, 1951.

LUNDQVIST, J., et al. Isolation and characterization of galactoglucomannan from spruce (*Picea abies*). **Carbohydrate Polymers**, v. 48, p. 29-39, 2002.

LUNDQVIST, J., et al. Characterization of galactoglucomannan extracted from spruce (*Picea abies*) by heat-fractionation at different conditions. **Carbohydrate polymers**, v. 51, p. 203-211, 2003.

MABUSELA, W.T., STEPHEN, A.M., BOTHA, M.C. Carbohydrate polymers from *Aloe ferox* leaves. **Phytochemistry**, v. 29, p. 3555–3558, 1990.

MACIEL, M.A.M., et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.

MIRANDA, M. et al. Effect of temperature on structural properties of *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) gel and Weibull distribution for modeling drying process. Food and Bioproducts Processing: **Transactions of the Institution of Chemical Engineers**, v. 88, p. 138-144, 2010.

MASCOLO, et al. Healing powers of Aloes. In: Reynolds, Tom. Aloes. **The genus Aloe**. 2004.

MASSIOU, P.; ROUAU, X.; THIBAUT, J. Isolation and characterization of the cell-wall fibres of carrot. **Carbohydrate Research**, v. 172, p. 217-227, 1988.

MOTYKIE, G.D; OBENG, M.K; HEGGERS, J.P. *Aloe vera* in wound healing. In: Reynolds, Tom. Aloes. **The genus Aloe**. 2004.

MUKHIDDINOV, Z. K. et al. Isolation and structural characterization of pectin homo and rhamnogalacturonan. **Talanta**, v. 53, p. 171-176, 2000.

NEWTON, L. E. Aloes in habitat. In: Reynolds, Tom. Aloes. **The genus**

Aloe. 2004. CRC press. 2004 . In: Reynolds, Tom. Aloes. **The genus Aloe**. 2004.

NISHINÃ, P. M.; FREEDLAND, R. A. The Effects of Dietary Fiber Feeding on Cholesterol Metabolism in Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 120, n. 7, p. 800-805, 1990.

NISHITANI, K.. The role of endoxyloglucan transferase in the organization of plant cell walls. **International Journal of Cytology**, v. 173, p. 157-206, 1997.

NORTHCOTE, D. H. Chemistry of the plant cell wall. Ann. Rev. **Plant Physiol.** , v. 23, p. 113-132, 1972.

O'NEILL, M.A.; YORK, W.S. The composition and structure of plant primary cell walls. In: The Plant cell wall. **Annual Plant Review**. eds. JKC. Rose CRC Press, v.8, p.1-54, 2003.

PAREDES, L.L.R. **Extração e caracterização dos polissacarídeos das raízes de lepidium meyenii e testes de atividade inseticida**. 76f., Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

PENG, F., et al. Rapid homogeneous lauroylation of whet straw hemicelluloses under mild conditions. **Carbohydrate Research**, v. 343, p. 2956-2962, 2008.

PETKOWICZ, C. L DE O., et al. Linear mannan in the endosperm of Schizolobium amazonicum. **Carbohydrate Polymers**, v. 44, p. 107-112, 2001.

PIEIDADE, J.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Comparação entre o efeito do resíduo do abacaxizeiro (caules e folhas) e da pectina cítrica de alta metoxilação nível de colesterol sanguíneo em ratos. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v.23, n. 2, p.149-156, 2003.

PIRES, V.M.P. **Estrutura e função de módulos não catalíticos envolvidos na degradação da parede celular vegetal: o efeito de enzimas exógenas na valorização nutritiva de dietas à base de Lupinus para leitões**. 296 f., Tese (Doutorado em Ciências

Veterinárias), Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2008.

POPPER, Z.A.; FRY, S.C. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. **Annals. of Botany**, v. 91, n.1, p 1-12, 2003.

POPPER, Z.A.; FRY, S.C. Primary cell wall composition of bryophytes and charophytes. **New Phytologist**, v. 64, n 1, 2004.

PUERTO, E. C., 2006. Influencia del Aloe vera L. sobre la respuesta inmune humoral de ratones Balb/C inmunizados contra el virus de la hepatitis B. **Rev Cubana Plant Med** , v. 11, n.3-4, 2006.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C. Lignin-hemicellulose complexes from the stem of Mimosa bracinga, Hoehne. An. **Acad. Bras. Ciênc.**, v. 54, p. 579-584, 1982.

REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C; GORIN, P. A. J. Location of O-acetyl groups in the acidic D-xylan of Mimosa scabrella. A study of O-acetyl group migration. Carbohydr. **Res.**, v. 135, p. 129-140, 1984.

REID, J. S.G., EDWARDS, M. E. In A.M. Stephen, Food polysaccharides and their applications New York: **Marcel Dekker**, p. 155–186, 1995.

REYNOLDS, T. Aloe chemistry. In: Aloes. **The genus Aloe**. 2004.

REVANAPPA, S.B.; NANDINI, C. D.; SALIMATH, P.V. Structural characterization of pentosans from hemicellulose B of wheat varieties with varying chapatti-making quality. **Food Chemistry**, v. 119, p. 27-33, 2010.

RIQUE, A. B.R.; SOARES, E. DE A.; MEIRELLES, C. DE M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev Bras Med Esporte**, v. 8, n. 6, p. 244-254, 2002.

RODRÍGUEZ-GARCÍA, R. et al. Growth, stomatal resistance, and transpiration of Aloe vera under different soil water potentials. **Industrial Crops Products**. , v. 25, n. 2, p. 123-128, 2006.



ROUBROEKS, J.P.; ANDERSSON, R.; ÅMAN, P. Structural features of (1→3), (1→4)-β-D-glucan and arabinoxylan fractions isolated from rye bran. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p.3-11, 2000.

SAGHIR, S., et al. Structure characterization and carboxymethylation of arabinoxylan isolated from Ispaghula ( *Plantago ovata*) seed husk. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 309-317, 2008.

SALEEM, R.; FAIZI, S.; DEEBA, F.; SIDDIQUIT, B. S.; QAZI, M. H. Anrhrones from Aloe Barbadensis. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1279-1282, 1997.

SILVA, B. P. DA; SILVA, G. DE M.; PARENTE, J.P. Chemical properties and adjuvant activity of a galactoglucomannan from *Acrocomia aculeata*. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 380-384, 2009.

STEVENS, P. F. (2001). **Angiosperm Phylogeny Website**. Version 9, June 2008. In: <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>. Acesso em 09/11/2010.

SUGANO, M.; WATANABE, S.; KISHI, A.; IZUME, M.;OHTAKARA, A. Hypocholesterolemic action of chitosans with differnt viscosity in rats. **Lipids**, v.23, n. 3, p.187-191, 1988.

SUN, R.C.; FANG, J. M.; TOMKINSON, J.; JONE, G. L. Acetylation of wheat straw hemicelluloses in N,N-dimethylacetamide:LiCl solvent system. **Industrial Crops and Products**, v.10, p. 209–218, 1999.

SUN, R. C.; SUN, X. F.; MA, X. H. Effect of ultrasound on the structural and physiochemical properties of organosolv soluble hemicelluloses from wheat straw. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 9, p. 95-101, 2002.

SUN, X.F., et al. Physiochemical characterization of residual hemicelluloses isolated with cyanamide-activated hydrogen peroxide from organosolv pre-treated wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1342-1349, 2005.

SUN, X.Z.; ANDREW, I.G.; JOBLIN, K.N.; HARRIS, P.J.; MCDONALD, A.; HOSKIN, S.O. Polysaccharide compositions of leaf cell walls of

forage chicory (*Cichorium intybus* L.). **Plant Science**, v. 170, n.1, p.18-27, 2006.

TAMAKI, Y. et al. Isolation and structural characterization of pectin from endocarp of *Citrus depressa*. **Food Chemistry**, v. 107, p. 352-361, 2008.

TEIXEIRA-SÁ et al. Isolation of alectin and a galactoxyloglucan from *Mucuna sloanei* seeds. **Phytochemistry**, v. 70, p.1965–1972, 2009.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, v. 4, p. 399-436, 2003.

TRINIDAD et. al. Dietary fiber from coconut flour: A functional food. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v 7, p. 309-317, 2006.

VEGA,A.G., et al.,. Aloe vera (*Aloe barbadensis* miller) as a component of functional foods. **Rev. Chil. Nutr.**, v. 32, n. 3, p. 208-214, 2005

VITOLO,M.R. **Nutrição – da gestação ao envelhecimento**. Ed. Rubio, 2008.

VRIESMANN , L. C. **Extração, caracterização e aspectos reológicos de polissacarídeos da polpa dos frutos de theobroma grandiflorum (cupuaçu)**. 177 f., Dissertação (Mestrado em Ciências-bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

XU et. al. Fractional and structural characterization of hemicelluloses from perennial ryegrass(*Lolium perenne*)and cocksfoot grass(*Dactylis glomerata*). **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 2073–2082, 2006.

WANG, X.S.; LIU, L.; FANG, J.N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, p. 95-101, 2005.

WU, J. H., XU, C. , SHAN, C. Y., TAN, R. X. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from *Aloe vera* var. *chinensis*. **Life Sciences**, v. 78, n. 6, p. 622-630, 2006.

ZONTA, F.; BOGONI, P.; MASOTTI, P.; MICALI, G. High-performance liquid chromatographic profiles of Aloe constituents and determination of aloin in beverages, with reference to the EEC regulation for flavouring substances. **J Chromatogr A**, v. 718, n1, p. 99-106, 1995.

WOODWARD, J.R.; FINCHER, G.B.; STONE, B.A. Water-soluble (1→3), (1→4)-β-D-glucanases from barley (*Hordeum vulgare*) endosperm. II. Fine structure. **Carbohydrate Polymers**, v. 3, p. 207-225, 1983.